

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS - SCIENCES

PAR

Jacqueline BAKÈS

Ingénieur-Chimiste E. N. S. C. S.

Licenciée ès-Sciences

Attachée de Recherches au C. N. R. S.

***Recherches sur le fractionnement,
la conformation et l'activité biologique
des acides ribonucléiques de transfert de levure***

Soutenue le 4 Juillet 1969 devant la Commission d'examen

MM. J. P. EBEL

Président

J. H. WEIL

G. DIRHEIMER

J. BRAHMS

} *Examineurs*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553609_0005

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS - SCIENCES

PAR

Jacqueline BAKÈS

Ingénieur-Chimiste E. N. S. C. S.

Licenciée ès-Sciences

Attachée de Recherches au C. N. R. S.

*Recherches sur le fractionnement,
la conformation et l'activité biologique
des acides ribonucléiques de transfert de levure*

Soutenue le 4 Juillet 1969 devant la Commission d'examen

MM. J. P. EBEL

Président

J. H. WEIL

G. DIRHEIMER

J. BRAHMS

} *Examineurs*



FACULTE DE STRASBOURG
UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE,
G. MILLOT

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN,
G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY,
Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, Mlle S. GILLET,
A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE,
P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL,
Ch. SADRON, E. TERROINE, H. VILLAT, H. WEISS,
Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T. T. P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T. T. P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle A. GAGNIEU	T. T. P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T. T. P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T. T. P.	Chimie
A. COCHE	T. T. P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T. T. P.	Mathématiques

P. TAGLANG	T.	Physique
J. P. LONCHAMP	T. T. P.	Physique
A. DELUZARCHE	T. T. P.	Chimie
J. B. DONNET	T. T. P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T. T. P.	Physique
A. ROCHE	T. T. P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P. S. C.	Zoologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T. T. P.	Physique
P. MIALHE	T. T. P.	Physiologie animale
J. P. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T. T. P.	Chimie
R. WEY	T. T. P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T. T. P.	Physique
M. DAUNE	P. S. C.	Physique
J. P. ADLOFF	T. T. P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T. T. P.	Méthodes mathématiques de la Physique
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T. T. P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P. S. C.	Physique
Mme M. BRINI	P. S. C.	Chimie
R. BARO	P. S. C.	Physique
H. DURANTON	P. S. C.	Botanique
R. WEISS	T. T. P.	Chimie
P. FEDERLIN	T. T. P.	Chimie
J. LERAY	P. S. C.	Physique
J. P. SCHWING	P. S. C.	Chimie
M. SIESKIND	P. S. C.	Physique
G. MONSONEGO	T.	Physique théorique
P. GABRIEL	T. T. P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères industriels
P. A. MEYER	T. T. P.	Mathématiques
G. WEILL	P. S. C.	Physique
J. M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P. S. C.	Chimie
E. FOLLENIUS	P. S. C.	Zoologie
J. LUCAS	P. S. C.	Géologie
J. J. THIEBOLD	P. S. C.	Biologie animale
G. GLAESER	T.	Mathématiques
J. H. WEIL	P. S. C.	Chimie biologique
D. FOATA	P. S. C.	Mathématiques

Professeurs Associés :

A. BANDERET	E. A. H. P.
R. CLELAND	Physique
G. PEROLD	Chimie
J. SAMPSON	Mathématiques

Maîtres de Conférences :

H. DANAN	Physique
Mme Chr. WINTER	Physique
J. P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
J. M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique
Fr. LACROUTE	Biologie végétale
A. GIRARDIE	Biologie animale
M. GOUNOT	Botanique
J. DEHAND	Chimie minérale
J. PRADINES	Mathématiques
F. BECKER	Physique mathématique
M. KAROUBI	Mathématiques
A. MIGNOT	Mathématiques appliquées
R. GERARD	Mathématiques
J. ROUX	Botanique
R. VOLTZ	Physique théorique
A. MICHAUD	Géologie
J. M. GIRAUD	Mathématiques
Y. BOULANGER	Chimie Biologique
D. DACUNHA-CASTELLE	Mathématiques
J. P. BRETAGNOLLE	Mathématiques
J. RIEHL	Chimie
C. DELLACHERIE	Mathématiques

Maîtres de Conférences Associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques
J. APSIMON	Chimie
R. CAIROLI	Mathématiques
E. DADE	Mathématiques
H. GOLDWHITE	Chimie
G. LETTA	Mathématiques
G. RINEHART	Mathématiques
M. NIKOLIC	Physique corpusculaire

Secrétaire général de la Faculté : G. SAINT-PE

Avant d'exposer nos travaux, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur EBEL qui nous a accueillie dans son laboratoire. Nous lui devons notre formation de biochimiste. Ses conseils et ses encouragements incessants nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Professeur WEIL qui a suivi de près l'élaboration de ce travail et dont les conseils nous ont été très précieux.

Nous tenons également à remercier le Docteur BRAHMS qui a dirigé la partie de ce travail relative au dichroïsme circulaire, ne nous ménageant ni son temps, ni ses conseils.

Nos remerciements s'adressent enfin à Monsieur le Professeur DIRHEIMER. Nous lui sommes très reconnaissante de nous avoir permis de nous familiariser avec les techniques d'isolement des tRNA spécifiques.

Nous tenons enfin à remercier tous nos amis du laboratoire qui nous ont permis d'effectuer ce travail dans une ambiance très sympathique. Nous remercions plus particulièrement Madame N. BEFORT pour sa collaboration au cours de l'étude de l'effet de la bromuration sur la capacité de transfert des tRNA et Madame C. EHRESMANN pour l'aide qu'elle nous a apportée lors de la mise au point du fractionnement du tRNA^{IIe} par la méthode de KATCHALSKI. Nous remercions également Mesdames A. KLEIN et G. NUSSBAUM et Mademoiselle C. SCHMITT dont la collaboration technique nous a été très précieuse.

I N T R O D U C T I O N

Les progrès de nos connaissances dans la compréhension des mécanismes de la synthèse protéique ont mis en évidence le rôle prépondérant des acides nucléiques de transfert (tRNA) dans la traduction du message génétique.

Le rôle de ces molécules est de fixer spécifiquement les aminoacides et de les transférer dans les protéines, la séquence des aminoacides dans la chaîne polypeptidique étant déterminée par les interactions qui s'établissent entre le RNA messenger (mRNA) porteur de l'information génétique du DNA et le tRNA spécifique de l'acide aminé. L'existence de ce type d'acide ribonucléique avait été postulée dès 1956 par CRICK qui avait proposé l'hypothèse de l'existence d'un tRNA adaptateur. Cette hypothèse fut confirmée, deux ans plus tard, par la caractérisation par HOAGLAND et coll. (1957) de ce type de RNA intermédiaire qui fut d'abord désigné sous le nom de RNA soluble (sRNA) en raison de sa présence dans la fraction soluble du cytoplasme. Ce terme de RNA soluble tend actuellement à être remplacé par celui de RNA de transfert (tRNA) à cause de sa fonction biologique.

On sait actuellement que le sRNA est en fait constitué d'un mélange de différents tRNA spécifiques de chaque acide aminé. Ces tRNA représentent un ensemble de macromolécules de poids moléculaire relativement faible (23 000 à 28 000), constituées d'environ 80 nucléotides. Leur constante de sédimentation varie de 3,5 à 4,5 S. Leur composition nucléotidique est caractérisée par des rapports de bases A/U et G/C voisins de l'unité, par une forte proportion de bases G et C et par l'existence d'un nombre relativement élevé de bases mineures. Tous possèdent comme séquence terminale un triplet commun pCpCpA. L'acide aminé va se fixer sur le nucléotide terminal adénylique par formation d'une liaison ester entre le groupement carboxylique de l'acide aminé et le OH en 2' et 3' du ribose.

Des progrès considérables ont été réalisés dans la connaissance de la structure primaire des tRNA. En effet, différents tRNA ont pu être fractionnés et leur séquence de bases déterminée : (levure : tRNA^{Ala}, HOLLEY et coll., 1965 ; tRNA^{Ser}, ZACHAU et coll., 1966 a et b ; tRNA^{Tyr}, MADISON et coll., 1966 ; tRNA^{Val}, BAEV et coll., 1966, 1967 ; tRNA^{Phe}, RAJBHANDARY et coll., 1967 ; levure torula : tRNA^{Val}, TAKEMURA et coll., 1968 ; E. coli : tRNA^{Tyr}, GOODMAN et coll., 1968 ; tRNA^{Met}, DUBE et coll., 1968 ; tRNA^{Val}, YANIV et BARRELL, 1969 ; foie de rat : tRNA^{Ser}, STAEHELIN et coll., 1968).

A la suite de la détermination de la structure primaire de ces tRNA, plusieurs modèles de structure secondaire ont été proposés. Le modèle en feuille de trèfle imaginé par HOLLEY et coll. pour le tRNA^{Ala} semble pouvoir être appliqué à tous les tRNA isolés jusqu'à présent. Ce modèle est caractérisé par l'existence de zones non appariées formant des boucles qui séparent des régions en double hélice.

FRESCO et coll. (1966) et SUEOKA et coll. (1966) ont mis en évidence l'existence d'une structure tertiaire nécessaire à l'activité biologique des tRNA. Mais, les caractéristiques de cette configuration tridimensionnelle sont encore hypothétiques.

L'un des problèmes fondamentaux de la biologie moléculaire est de relier la structure des tRNA à leurs diverses activités biologiques, en particulier à la propriété de fixer spécifiquement les aminoacides (capacité acceptrice) et à la propriété de les transférer dans les protéines (capacité de transfert). Malgré l'importance des informations sur la structure primaire des tRNA, les connaissances relatives aux sites responsables, dans ces molécules, de ces activités restent encore fragmentaires. Il apparaît de plus en plus évident que ce problème est étroitement lié à celui de la conformation tridimensionnelle des tRNA. La connaissance de cette structure semble donc fondamentale pour la compréhension des relations entre structure et activités dans les tRNA. Pour la reconnaissance plus

précise, au sein de cette structure tridimensionnelle, des sites actifs impliqués dans les activités biologiques, une approche fréquemment employée a été l'étude de l'influence de modifications des tRNA, en particulier de modifications chimiques, sur leur activité biologique.

Monsieur le Professeur EBEL m'a proposé, comme thème général de mon travail, l'étude du problème des relations entre la structure et certaines activités des tRNA. Etant donné la complexité des phénomènes étudiés, il nous est rapidement apparu qu'il était nécessaire d'effectuer ces études sur des tRNA purifiés, spécifiques d'un seul aminoacide. Au moment où nous avons commencé notre travail, les techniques de fractionnement des tRNA étaient encore peu nombreuses et leur emploi très restreint. Nous avons donc été amenés à effectuer la purification de deux tRNA : le tRNA^{Phe} et le tRNA^{Ile}. L'isolement du tRNA^{Phe} a été effectué par la méthode de distribution en contre-courant mise au point pour le fractionnement des tRNA de levure de bière par DIRHEIMER et EBEL (1967). La purification du tRNA^{Ile} a été réalisée, en collaboration avec Madame C. EHRESMANN, par la méthode chimique de fractionnement décrite par KATCHALSKI et coll. (1966). Nous avons comparé les résultats obtenus par cette technique et ceux obtenus en effectuant le fractionnement du tRNA^{Ile} par distribution en contre-courant. Ces travaux relatifs au fractionnement des tRNA sont décrits dans la première partie de notre travail.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous exposerons les résultats d'une étude qui a été effectuée, sous la direction du Dr BRAHMS au Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg, sur la conformation des tRNA par des mesures de dichroïsme circulaire. Nous venons d'évoquer l'importance de la structure tridimensionnelle des tRNA pour leurs activités biologiques. Cette structure est encore inconnue et nous avons pensé que les études par dichroïsme circulaire étaient susceptibles d'apporter des informations intéressantes sur la conformation des tRNA en solution. Nous avons, d'une part, étudié l'allure du spectre de

dichroïsme circulaire de divers tRNA, d'autre part, l'effet de la température sur ce spectre. Nous avons de plus essayé de voir, s'il était possible de mettre en évidence par cette méthode, une différence de conformation entre un tRNA non chargé et un aminoacyl-tRNA.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons étudié l'effet d'une modification chimique sur l'une des propriétés fondamentales des tRNA, à savoir la capacité de transfert. Nous avons déjà indiqué que la méthode qui a été, de loin, la plus utilisée pour la détermination des relations entre structure et activités biologiques des tRNA était l'étude de l'influence des modifications des tRNA sur leurs activités biologiques. De très nombreuses modifications chimiques ont été étudiées (pour une revue de la question, voir MIURA (1967) et EBEL (1968) : halogénéation, alcoylation, action de l'acide nitreux, de l'hydroxylamine, de l'acide perphthalique, de carbodiimides, de l'acrylonitrile, du bromure de cyanogène, etc.

Les réactions d'halogénéation sont particulièrement intéressantes et ont déjà fait l'objet de nombreuses études, en particulier dans notre laboratoire : réaction de bromuration (DUVAL et EBEL, 1964), de chloruration (DUVAL et EBEL, 1965, 1966), d'ioduration (YOSHIDA, DUVAL et EBEL, 1966). L'effet de la bromuration sur la capacité acceptrice a fait en particulier l'objet de plusieurs travaux (YU et ZAMECNIK, 1963 ; WEIL et coll., 1964 ; EBEL et coll., 1965). Nous avons, de notre côté, étudié l'effet de cette modification sur la capacité de transfert des tRNA. Il est maintenant établi que l'une des interactions fondamentales dans cette activité est l'interaction codon du RNA messenger-anticodon du tRNA. Mais, il est certain que ce phénomène est plus complexe et ne peut être ramené uniquement à ce type d'interactions. Il faut, en particulier, tenir compte des interactions avec les ribosomes et avec les divers facteurs récemment mis en évidence et nécessaires à l'attachement des tRNA aux ribosomes. Dans tous ces phénomènes, la conformation du tRNA doit jouer un rôle important et il faudra tenir compte de l'effet sur cette conformation de la modification chimique étudiée. Ce travail a été effectué en collaboration avec Madame N. BEFORT, Madame C. EHRESMANN et Monsieur J.H. WEIL.

PREMIERE PARTIE

METHODES DE FRACTIONNEMENT DU PHENYLALANINE- ET DE L'ISOLEUCINE-tRNA

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES DIFFERENTES METHODES DE FRACTIONNEMENT DES tRNA

Avant d'exposer nos résultats, nous allons rappeler brièvement les différentes méthodes employées pour fractionner les tRNA. Elles peuvent se diviser en deux groupes : les méthodes physicochimiques et les méthodes chimiques.

A. METHODES PHYSICOCHIMIQUES

La structure primaire des tRNA, qui conditionne leur poids moléculaire ainsi que leur structure secondaire et tertiaire, influe indirectement sur toute une série de propriétés physiques des tRNA qui ont été mises à profit pour leur séparation. On a en particulier fait appel à des méthodes basées sur :

- la solubilité des tRNA qui influe sur leur coefficient de partage entre deux solvants ou leur précipitation selon la force ionique du milieu,
- la taille des molécules dans l'espace,
- leur charge locale dans l'espace.

Nous passerons en revue les différentes techniques utilisées.

I. DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT

C'est une méthode basée sur le coefficient de partage K des tRNA entre deux solvants non miscibles. K est une constante définie comme étant le rapport, pour une température donnée et à l'équilibre, des concentrations de la substance étudiée dans les phases supérieure et inférieure :

$$K = C_s / C_i$$

Nous décrirons cette méthode de façon plus détaillée dans le chapitre II.

II. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

1) Chromatographie d'adsorption

Parmi les nombreuses méthodes employées que nous ne pouvons passer en revue dans cet exposé, nous nous bornerons à signaler les plus intéressantes.

L'adsorption sur albumine méthylée met en jeu la taille des molécules, leur composition en bases et leur structure secondaire (SUEOKA et CHENG, 1962 ; SUEOKA et YAMANE, 1962 ; OKAMOTO et KAWADE, 1963). Elle est utilisée par divers auteurs et notamment en complément de la méthode de distribution en contre-courant (MELCHERS et ZACHAU, 1965).

L'adsorption sur hydroxyapatite a été utilisée pour la première fois dans le domaine des tRNA par HARTMAN et COY (1961). Le mécanisme sur lequel repose le fractionnement par ce type de chromatographie est l'interaction entre les groupements phosphate des acides nucléiques et les ions calcium des cristaux d'hydroxyapatite. Dans le cas des polynucléotides de structure linéaire, la seule propriété responsable est donc la densité linéaire de charge (BERNARDI, 1965). Dans le cas des tRNA qui ont une structure tertiaire complexe, le fractionnement dépendra vraisemblablement de la distribution et de l'accessibilité des ions phosphate à l'extérieur de la

molécule (DIRHEIMER, 1968). La chromatographie sur hydroxyapatite a donné de bons résultats dans le fractionnement des tRNA de E. coli (MUENCH et BERG, 1966 ; PEARSON et KELMERS, 1966 ; HARDING, SCHAUER et HARTMAN, 1966), de levure de bière (DIRHEIMER, 1968) et de graines de lupin jaune (LEGOCKI et PAWELKIEWICZ, 1967). Cependant, cette méthode de fractionnement chromatographique ne permet pas d'obtenir, en une seule étape, un tRNA spécifique. Il est donc recommandé de la combiner à d'autres méthodes chromatographiques ou bien de la coupler avec une distribution en contre-courant. DIRHEIMER et coll. en combinant la chromatographie sur hydroxyapatite à une chromatographie sur DEAE-cellulose à 65° ont pu isoler, à partir de fractions enrichies en tRNA^{Asp} par la méthode de distribution en contre-courant, un tRNA^{Asp} purifié à 80 p.100. DIRHEIMER et KUNTZEL ont obtenu un tRNA^{Arg}_{III} par une technique semblable. Un lysine-tRNA a pu être fortement enrichi (DIRHEIMER, 1968), enfin le phénylalanine-tRNA de levure a été récemment obtenu par ZIMMER, 1968.

2) Chromatographie de partage

Ces techniques sont basées sur le partage d'une substance entre deux phases, l'une fixe, l'autre mobile. Le coefficient de partage est défini comme étant le rapport des concentrations entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K = C_s / C_m$$

a - Chromatographie d'exclusion-diffusion ou tamisage moléculaire

Dans ce cas, phase stationnaire et mobile sont identiques. Des molécules diffusent, plus ou moins librement en fonction de leur masse moléculaire, entre les phases aqueuses intra- et extra-granulaires. Des dextrans artificiels, dont on connaît le degré de réticulation, sont employés.

Parmi ces méthodes, on peut citer celle utilisée par RÖSCHENTHALER et FROMAGEOT (1965) qui consiste à faire passer sur

Sephadex G100 un tRNA de E. coli et à l'éluer par un gradient décroissant en NaCl, en présence d'acétate de magnésium 0,05 M.

Un nouveau type de fractionnement utilisant la filtration sur gel de dextrane a été décrit récemment par LINDAHL et coll. (1967). Ces auteurs tirent profit de l'augmentation de la taille moléculaire des tRNA quand ils sont dénaturés. Cette propriété appliquée à des tRNA stables à l'état dénaturé permet de les séparer sur Sephadex des autres tRNA qui reprennent spontanément leur état natif et qui sont de taille plus petite.

b - Chromatographie de partage

Les auteurs ont fait appel à la propriété qu'ont les sels d'ammonium quaternaire des tRNA d'être solubles dans des solvants organiques (AUBEL-SADRON et coll., 1960 et 1961 ; WEIL et EBEL, 1962). Les tRNA peuvent être régénérés à partir des solvants organiques par une solution saline (chlorure de sodium ou bromure de sodium) qui les fait repasser en solution aqueuse. Ce traitement ne leur fait pas perdre leur activité biologique tout en les dénaturant. Mais, la renaturation se fait spontanément à 37° en présence d'ions Mg^{++} . Deux types de chromatographies basées sur ce principe ont été élaborées.

La chromatographie classique liquide-liquide se fait entre une phase aqueuse stationnaire liée au support et une phase organique mobile. EVERETT et coll. (1960) avaient constaté que le gel de silice n'était pas le support idéal pour cette chromatographie de partage, aussi TANAKA et coll. (1962) utilisèrent-ils le Sephadex G25. D'autres auteurs ont, depuis, développé cette méthode en utilisant différents systèmes de solvants et de supports : cellulose (SCHWEIGER et ZACHAU, 1965) ou Sephadex G25 (NATHENSON et coll., 1965 ; BERGQUIST et coll., 1965 ; MUENCH et BERG, 1966).

Ces méthodes combinées à des chromatographies sur DEAE-Sephadex ont permis d'isoler 4 glycine- et 4 lysine-tRNA de levure de

bière (BERGQUIST, 1966). Dans la technique élaborée par KELMERS et coll. (1965), la phase organique est fixée sur un support solide et la phase aqueuse perfuse la colonne, d'où le nom de chromatographie en phase inversée qui a été donné à cette méthode. Le support solide est constitué de terre de diatomée hydrophobe (chromosorb). La phase organique tient en solution les tRNA qui restent ainsi fixés sur la colonne. Ils en sont élués par un gradient de chlorure de sodium qui perfuse la colonne. Cette méthode a permis aux auteurs d'isoler un phénylalanine- et un leucine-tRNA de E. coli (KELMERS, 1966 a ; KELMERS, 1966 b).

DIRHEIMER et KUNTZEL (1966) ont appliqué cette technique au tRNA de levure de bière et BONNET et coll. (1969) en combinant cette méthode à une distribution en contre-courant ont isolé un tRNA^{Val} de levure de bière pur à 90 p. 100.

Enfin, des auteurs japonais ont pu fortement purifier 6 tRNA (tRNA^{Met}, tRNA^{Val}, tRNA^{Phe} et tRNA^{Tyr} de E. coli : NISHIMURA et coll., 1967 ; tRNA^{Ser} de E. coli : ISHIKURA et coll., 1968 ; tRNA^{His} de levure : TAKEISHI et coll., 1967) en combinant cette méthode à une chromatographie sur DEAE-Sephadex.

3) Chromatographie par échange d'ions

Ces techniques utilisent la capacité des échangeurs d'ions d'échanger leurs groupements ionisables contre un ion en solution. La nature de la résine et des substances en solution, le pH du milieu, la présence d'agents complexants conditionnent ces méthodes. Les plus intéressants parmi les échangeurs sont la DEAE-cellulose qui fut appliquée pour la première fois en 1961 à l'enrichissement d'un leucyl-tRNA^{Leu} (NISHIYAMA et coll., 1961). Cette cellulose a été ensuite utilisée avec différents types d'éluants : NaCl (KAWADE et coll., 1963), NaCl ou urée à pH différents (CHERAYIL et BOCK, 1965). Ces mêmes auteurs ont également utilisé le

DEAE-Sephadex avec des gradients semblables. SMITH (1966) utilisa un système de gradient de pH et de LiCl pour le fractionnement des tRNA de Salmonella Typhimurium. Enfin, des gradients de sulfate d'ammonium, de KCl, de phosphate ou de borate en présence de diméthylformamide ou d'autres solvants (MIYAZAKI et coll., 1966a,b) ont permis de fractionner les tRNA de Torulopsis utilis et de purifier les alanine I-, valine I- et isoleucine-tRNA de ce microorganisme (MIYAZAKI et coll., 1967).

L'emploi de la DEAE-cellulose à chaud a été introduit par GOLDWHAIT et KERR (1962) et développé par BAGULEY et coll. (1965). L'élévation de température a pour conséquence de rompre les liaisons hydrogène entre bases de la molécule, ce qui permet d'augmenter les possibilités d'attachement sur la DEAE-cellulose. L'élution nécessite alors une concentration saline plus élevée. BERGQUIST et coll. (1965) ont utilisé un gradient croissant de NaCl, à température constante, et MIRZABEKOV et coll. (1966) un gradient décroissant de température (75° - 30°) et de concentration saline (NaCl 0,75 M - 0,5 M) pour fractionner le tRNA de levure.

Deux nouveaux échangeurs d'ions, la DEAE benzoylée (BD cellulose) et la DEAE benzoylée-naphtoylée, ont été récemment préparés par GILLAM et coll. (1967). Ces celluloses fixent les tRNA par un processus faisant intervenir à la fois des interactions ioniques et des attractions entre les groupements aromatiques de la cellulose et certaines bases des tRNA n'intervenant pas dans la structure secondaire. Les auteurs ont pu obtenir avec cette cellulose un bon fractionnement des tRNA de levure de bière en les éluant avec un gradient de NaCl. Le phénylalanine-tRNA fortement retenu ne peut être élué qu'avec de l'urée ou des solvants organiques et a ainsi pu être préparé à l'état très purifié (WIMMER et coll., 1968). La raison de cette affinité particulière n'a pas encore pu être expliquée. D'après les auteurs, des liaisons hydrophobes et hydrogène participeraient à cette fixation. Les résultats de DIRHEIMER et EBEL concernant la forte solubilité de ce tRNA dans les solvants organiques peuvent corroborer cette hypothèse.

GILLAM et coll. (1967) ayant constaté que l'introduction d'un résidu aromatique au bout accepteur du tRNA augmente fortement les interactions non ioniques entre tRNA et échangeur ont pu, en chargeant enzymatiquement la tyrosine et le tryptophane sur leurs tRNA respectifs, fixer préférentiellement ces tRNA sur la colonne et les purifier ainsi fortement (MAXWELL et coll., 1968). Enfin, le procédé a pu être généralisé pour l'isolement de tous les tRNA.

III. PRECIPITATION FRACTIONNEE

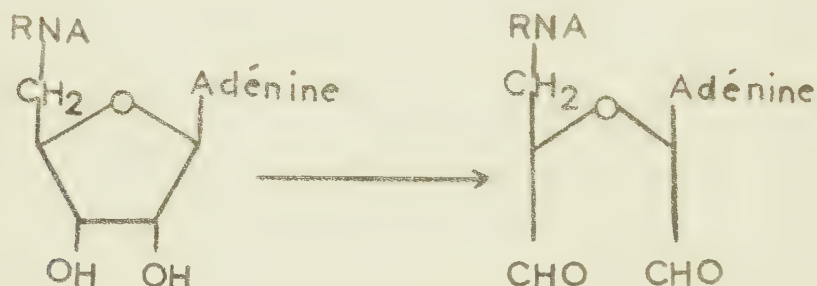
Il faut aussi noter que certains auteurs ont employé, afin de parachever la purification des tRNA, la précipitation fractionnée en présence de divers cations inorganiques ou organiques. C'est ainsi que SMITH et coll. (1959) utilisèrent le sulfate d'ammonium de 65 p. 100 à 100 p. 100 de saturation à 44° et à pH 7,5 et purent enrichir les tRNA spécifiques de la leucine, la thréonine et l'isoleucine. CANTONI (1960) a soumis du tRNA de foie de lapin à la précipitation fractionnée par la spermine à pH 5,6.

B. METHODES CHIMIQUES

L'une des propriétés caractéristiques du tRNA est de pouvoir fixer spécifiquement sur son adénosine terminale un aminoacide déterminé. Si à une solution de tRNA total préalablement débarrassé de tous les aminoacides on ajoute un aminoacide donné, seuls les tRNA spécifiques de cet aminoacide seront capables de le fixer. Il sera possible de cette manière de distinguer un tRNA chargé de tous les autres tRNA non chargés. Mais, cette différence entre les deux types de tRNA est faible. Le fait pour un tRNA d'avoir fixé un aminoacide, ne modifie que peu sa masse et il est difficile d'isoler par cette technique un tRNA spécifique. Deux méthodes ont été utilisées pour essayer d'augmenter cette différence entre tRNA non chargés et tRNA chargés. L'une consiste à modifier les tRNA non chargés,

l'autre consiste au contraire à modifier les tRNA chargés. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée.

La première méthode est basée sur la propriété de l'acide périodique de pouvoir oxyder le glycol en donnant un dialdéhyde. Or, un tRNA non chargé possède son adénosine terminale libre. Les tRNA non chargés, après l'action de l'acide périodique, seront sous forme aldéhydique alors que les tRNA chargés ne le seront pas.



En fixant sur les tRNA oxydés un colorant, ZAMECNIK et coll. (1960) puis STEPHENSON et ZAMECNIK (1961-1962) ont réussi à les séparer du tRNA^{Val} chargé avec son aminoacide et n'ayant donc pas été oxydé. Le tRNA^{Val} obtenu avait un taux de pureté de 60 à 90 p. 100. En utilisant la propriété des tRNA oxydés de former des hydrazones, VON PORTATIUS et coll. (1961) et ZACHAU et coll. (1961) ont également obtenu un tRNA^{Val} purifié 10 fois environ. ZUBAY (1962), d'autre part, a réussi à obtenir un tRNA^{Leu} de E. coli purifié à 70 p. 100 en faisant passer les tRNA oxydés sur une colonne d'aminoéthylcellulose avec laquelle ils réagissent pour donner une base de SCHIFF.

La deuxième méthode fait intervenir une modification de l'acide aminé fixé au tRNA. BROWN et coll. (1961) employèrent ce procédé. Ils combinèrent la tyrosine fixée sur son tRNA avec le polydiazostyrène et la diazobenzyl-cellulose. Après l'élimination du tRNA non chargé par lavage, le tRNA spécifique est détaché de son aminoacide par incubation à pH 10.

JAMES et coll. (1967) ont récemment fait appel à une technique semblable pour isoler le cystéine-tRNA. Ce tRNA chargé avec son aminoacide est retenu sur une colonne de polysaccharide mercurique (organomercurique). Ici, c'est le groupement SH de la cystéine qui est responsable de la condensation. Le cystéine-tRNA est ensuite élué par du tampon Tris 0,02M pH 7,2 et possède un degré de pureté final de 99 p.100.

Enfin, tout récemment, GILLAM et coll. (1968) ont élaboré une méthode chimique générale d'isolement de tRNA spécifiques. Ils ont tiré parti de l'affinité de la BD cellulose pour les groupements aromatiques pour développer cette technique. En introduisant un groupement phénoxyacétique ou naphtho^{xy}acétique sur le groupement aminé de l'aminoacyl-tRNA, ce tRNA est fortement retenu par la cellulose alors que les autres tRNA sont élués. Il suffit ensuite de l'élué avec de l'éthanol et d'enlever à pH 9 le groupement aminoacide substitué estérifiant le tRNA. GILLAM et coll. (1968) ont illustré cette méthode en isolant, à l'état très purifié, les tRNA spécifiques de l'acide aspartique, de la glycine, de la méthionine et de la thréonine de levure de bière.

MEHLER et BANK (1963) ont formé un tRNA-valine-polypeptide par condensation du N-carboxyanhydride de l' ξ -trifluoroacétyl-lysine. Le polymère formé sur le groupement aminé entraîne la précipitation du tRNA-polypeptide qui peut être séparé des autres tRNA. Le polypeptide peut être détaché à pH 9,1 en milieu dioxane par un mélange carbonate-bicarbonate.

LITTAUER et coll. (1964) condensèrent le poly- β -benzylaspartate sur le tRNA^{Ser}. Le tRNA-polypeptide coprécipite avec le poly- β -benzylaspartate. Ces deux composés dissous dans le DMF sont séparés par une colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec du DMF. Le poly- β -benzylaspartate est éliminé par lavage avec du DMF alors que le tRNA-polypeptide reste fixé sur la colonne. Il est élué par NaCl M puis hydrolysé à pH 10 pendant 1 heure à 37°. Mais, le polypeptide augmente considérablement la stabilité

de la liaison ester entre le tRNA et l'acide aminé. Le taux d'hydrolyse obtenu après avoir incubé pendant 1 heure à 37° n'est que de 30 p. 100. De plus, le tRNA est partiellement dégradé.

Dans une seconde publication, KATCHALSKI et coll. (1966) ont décrit diverses modifications de cette méthode. La plus importante porte sur la séparation du poly- β -benzylaspartate-aminoacyl-tRNA des autres tRNA qui s'effectue par différence de solubilité dans l'eau. Ces auteurs ont obtenu un tRNA^{Val} de E. coli possédant un degré de pureté de 50 à 60 p. 100.

C'est cette dernière méthode que Monsieur le Professeur EBEL nous a demandé d'appliquer à la purification de l'isoleucine-tRNA de levure.

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT PAR DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT DU PHENYLALANINE-tRNA DE LEVURE DE BIÈRE

La méthode de distribution en contre-courant s'est révélée très fructueuse pour isoler des quantités importantes de tRNA. Décrite pour la première fois par WARNER et WAIMBERG (1958) pour le RNA, elle a été développée avec beaucoup de succès par HOLLEY et coll. (1959-1960) qui ont pu isoler le tRNA^{Ala} puis en déterminer la structure primaire (HOLLEY et coll., 1965).

Ces auteurs utilisaient comme solvant, un système à base de tampon phosphate, d'isopropanol et de formamide. HOSKINSON et KHORANA (1965) ont pu, par cette méthode, isoler du tRNA^{Phe} très purifié. D'autres systèmes ont été mis au point, l'un par ZACHAU et coll. (1961), l'autre par DOCTOR et CONNELLY (1961). Ces deux systèmes ont permis l'isolement de deux tRNA^{Ser} (ZACHAU et coll., 1966 ; CONNELLY et DOCTOR, 1966).

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Distribution en contre-courant

La distribution en contre-courant d'un tRNA de levure de bière (BOEHRINGER, Mannheim) a été effectuée en chambre thermostatée à 24° avec un appareil Post Scientific Instruments (New-York) type B₅ de 500 tubes de 10 ml de capacité dans chaque phase.

Nous avons utilisé le système de phase décrit par HOLLEY et coll. (1963). Un tampon phosphate a été préparé en dissolvant 1 700 g de NaH₂PO₄, H₂O et 1 100 g de K₂HPO₄ dans 8 litres d'eau distillée. Après

agitation, nous avons obtenu un volume de 8 940 ml auquel on a soutiré 200 ml qui ont servi ultérieurement à la dissolution de l'échantillon de tRNA. Pour réaliser les deux phases, on a ajouté aux 8 740 ml de tampon restant, 580 ml de formamide (MERCK) et 2 440 ml d'isopropanol (MERCK). Après agitation et repos à 24°, le système avait un rapport de phase organique / phase aqueuse égal à 7/5.

L'échantillon de tRNA à fractionner a été dissous dans 220 ml du système de solvants précédent (110 ml de chaque phase) de la façon suivante : une solution de 1,5 g de tRNA dissous dans 100 ml du tampon phosphate précédent a été additionnée de 28 ml d'isopropanol et de 6,7 ml de formamide. Puis, on a ajouté peu à peu, avec des agitations et des repos successifs, des quantités de phase inférieure et de phase supérieure jusqu'à l'obtention de 220 ml du système de deux phases dans le rapport 1/1.

Les 10 premiers tubes de l'appareil de distribution en contre-courant ont été remplis chacun avec 10 ml de chaque phase de l'échantillon. Les produits insolubles de l'interphase n'ont pas été introduits dans l'appareil. Les 490 autres tubes de l'appareil ont été remplis chacun avec 10 ml de phase inférieure du système de solvant.

Une distribution en contre-courant de 1 100 transferts (15 minutes d'agitation suivies de 10 minutes de repos au début du fractionnement, réduites à 5 minutes en fin de fractionnement) a ensuite été effectuée. A l'extrémité des 500 tubes de l'appareil, un collecteur de fractions a recueilli les phases supérieures en fractions de 20 ml. Après la distribution, les premiers produits recueillis dans le collecteur ont donc subi 500 transferts, les derniers 1 100 transferts. Les fractions restant dans l'appareil ont également subi 1 100 transferts. Elles ont été retirées à l'aide d'une seringue. Les densités optiques des différentes fractions organiques, diluées 3 fois avec de l'eau, ont été lues à 260 mμ dans des cuves de 5 mm de chemin optique.

2) Récupération des tRNA à partir des fractions du contre-courant

Les tRNA ont été extraits, à partir des fractions du contre-courant, par le procédé de APGAR et coll. (1962) en utilisant des ampoules à décantation de 2 litres. Ce procédé consiste à éliminer d'une part l'isopropanol et la formamide par des solvants dans lesquels les tRNA ne sont pas solubles, d'autre part, les sels en extrayant le tRNA dans le méthylcellosolve (2-méthoxyéthanol).

Les fractions recueillies à partir de l'appareil à contre-courant sont extraites, alors que les fractions du collecteur qui ne renferment que la phase organique doivent d'abord être additionnées de 100 ml d'eau. A une fraction de 400 ml on ajoute ensuite un volume égal d'éther (MERCK) qui extrait l'isopropanol. On agite et l'on jette la phase supérieure. La phase inférieure est additionnée de 100 ml de méthylcellosolve. Après agitation, on écarte la phase inférieure, ce qui élimine les phosphates. Enfin, à la phase supérieure on ajoute 400 ml de butanol (FROLABO) et 700 ml d'éther pour enlever le reste d'isopropanol, de formamide et de méthylcellosolve. Après 2 heures de décantation, on recueille la phase inférieure renfermant le tRNA. Celle-ci est dialysée dans des tubes VISKING de 70 cm de long et de 5 cm de diamètre. On effectue trois dialyses successives contre de l'eau désionisée. La solution obtenue est concentrée à 5 ml, à la température de 25°, dans un évaporateur rotatif. Ces 5 ml sont transvasés dans un tube à centrifuger gradué de 50 ml, le ballon est lavé et le volume final est amené à 10 ml avec les eaux de lavage.

Les solutions de tRNA sont conservées congelées à -20°. On peut également les précipiter par addition d'éthanol en présence d'ions Na^+ ou K^+ , les centrifuger et les laver puis les sécher sur P_2O_5 .

3) Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases

Les aminoacyl-tRNA synthétases ont été préparées selon la technique décrite par WEIL et coll. (1964) avec les modifications apportées par

divers travaux du laboratoire relatés par DIRHEIMER et EBEL (1967) et GIEGE et EBEL (1968).

La préparation enzymatique a été obtenue à partir d'une levure de boulangerie récoltée en phase de croissance à partir d'une culture effectuée à 30° sous aération sur un milieu contenant pour 1 litre d'eau :

citrate de sodium (MERCK)	:	9,4	g
acide citrique	:	3,76	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	:	1	g
Yeast extract (DIFCO)	:	10	g
glucose	:	50	g

ensemencé avec 10 g de levure par litre de milieu.

Lorsque le poids de la levure a doublé, la culture est stoppée en la versant sur de la glace pilée. La levure est récoltée par centrifugation. Le culot de levure est lavé deux fois avec le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 ; KCl 0,06 M ; MgCl_2 0,01 M ; cystéine 0,001 M (tampon T).

a - Broyage des cellules

10 g de levure additionnée de 10 ml de tampon T ont été broyés en présence de 50 g de billes de verre de 0,5 mm de diamètre dans le broyeur cellulaire BRAUN pendant 3 minutes avec refroidissement au moyen d'un jet de neige carbonique. Les billes de verre sont éliminées par centrifugation à 17 000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite centrifugé à 50 000 tours/minute pendant 1 heure et demie (105 000g).

b - Elimination des aminoacides

Les 2/3 supérieurs du surnageant sont débarrassés des aminoacides qui les contaminent en les faisant passer sur une colonne de Sephadex G25 (diamètre 1 cm, hauteur 42 cm) équilibrée avec le tampon T.

c - Elimination des tRNA contenus dans la préparation par chromatographie sur DEAE-cellulose

Les 8 premiers ml renfermant des protéines (vérification par lecture de la D. O. à 280 mμ) ont été recueillis et passés sur une colonne contenant 2,5 ml de DEAE-cellulose traitée pendant 30 minutes par NaOH N à raison de 1 litre pour 30 g de cellulose puis lavée avec le tampon T jusqu'à équilibration. L'élution est effectuée avec ce tampon et l'on recueille les 25 premiers ml.

d - Dosage de la préparation enzymatique

Pour une préparation dépourvue d'acides nucléiques, la concentration en protéines (mg/ml) est donnée par la relation suivante :

$$(D.O._{280} \times 1,55) - (D.O._{260} \times 0,76)$$

La préparation enzymatique a été répartie en plusieurs fractions de 2 à 3 ml et conservée à -60°. Son activité pour la plupart des aminoacides est stable pendant plusieurs jours.

3) Détermination de l'activité acceptrice des tRNA

Le milieu réactionnel contient pour un volume final de 1 ml :

protéines enzymatiques	:	600 μg
Tris-HCl pH 7,4	:	60 μg
KCl	:	36 μmoles
ATP	] 0,05 ml d'une solution commune 0,1 M en ATP et 0,1 M en MgCl ₂ ajustée à pH 7	5 μmoles
MgCl ₂		11 μmoles
cystéine	:	5 μmoles
sérumalbumine bovine	:	200 μg
¹⁴ C-aminoacides (environ 1 μC)	:	0,1 à 0,2 μmole
tRNA	:	20 à 200 μg

La quantité de protéines utilisée représente le maximum nécessaire pour la plupart des aminoacides.

Le pH du milieu est ajusté à 7,4 et les réactions sont réalisées dans des tubes à centrifuger côniques. Après 30 minutes d'incubation à 37°, la réaction est stoppée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Après 30 minutes de précipitation à 4°, le précipité recueilli par centrifugation est lavé à deux reprises avec 5 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 puis deux fois avec 5 ml d'alcool éthylique à 95°. Tous les lavages ont été effectués à 4°.

Le précipité dissous dans 0,3 ml d'eau a été repris par 10 ml de mélange scintillateur de composition suivante :

BBOT : bis-5'-ter. butylbenzoxazolyl (2')thiophène (CIBA, Bâle)	:	4 g
naphtalène (PROLABO)	:	80 g
toluène (MERCK)	:	600 ml
méthylcellosolve (MERCK)	:	400 ml

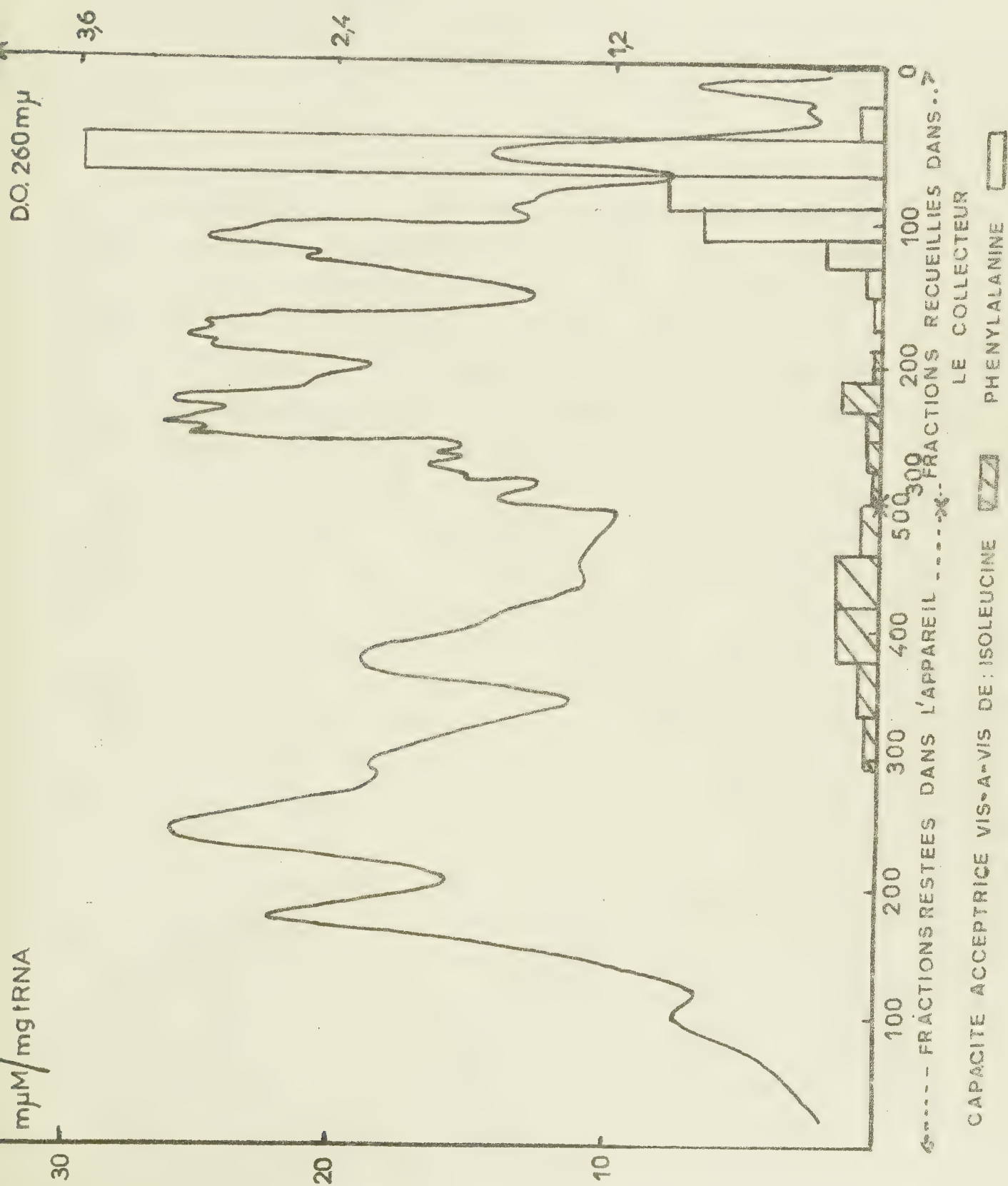
La radioactivité est mesurée au compteur à scintillation Tricarb-PACKARD. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides aminés fixés par mg de tRNA.

II. RESULTATS

La figure 1 donne le profil d'absorption ultraviolet obtenu. A l'extrémité droite se trouvent les fractions recueillies les premières. Elles renferment les tRNA les plus solubles dans la phase organique. De gauche à droite, on trouve donc les tRNA dans un ordre de coefficient de partage phase organique / phase aqueuse croissant.

On constate la présence de 4 pics dans les fractions recueillies dans le collecteur et renfermant les tRNA migrant le plus rapidement. Ils sont précédés d'un petit pic qui représente les substances colorées provenant du produit commercial. Les fractions restées dans l'appareil montrent la présence de 3 grands pics.

Figure 1 - DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT DE tRNA DE LEVURE DE BIÈRE



Plusieurs fractions voisines ont été rassemblées de façon à obtenir de nouvelles fractions de 200 à 400 ml chacune. Les tRNA ont été extraits et concentrés selon la technique décrite plus haut.

1) Phénylalanine-tRNA

Sur les fractions ainsi préparées, nous avons d'abord testé la capacité fixatrice vis-à-vis de la phénylalanine. On trouve un seul pic fixant cet aminoacide. La figure 1 donne les résultats obtenus. Une contamination par le tRNA^{Tyr} a pu être décelée, de l'ordre de 1 p.100.

Cette méthode permet d'obtenir, en une seule étape, un tRNA^{Phe} avec un degré de pureté très élevé. Pour débarrasser le tRNA^{Phe} des substances colorées qui le contaminaient, nous avons utilisé la méthode décrite par DIRHEIMER (1968). Le tRNA^{Phe} a été chromatographié sur une colonne d'hydroxyapatite HTP (CALBIOCHEM, Los Angeles - Californie) de 60 cm de hauteur et 1 cm de diamètre, équilibrée avec un tampon phosphate pH 5,8 ; 0,2 M. Les matières colorées apparaissent dans l'éluat avant le tRNA.

Si l'on prend comme poids moléculaire des tRNA la valeur 27 000, on peut calculer qu'un tRNA peut fixer 37 μ g d'acides aminés par mg. Nous prendrons cette valeur comme correspondant à 100 p.100 de pureté. Dans ces conditions, le tRNA^{Phe} que nous avons obtenu avait une pureté de 80 p.100. Remarquons que cette valeur est une valeur minima, car nous n'avons pas toujours opéré dans les conditions optima pour la fixation de la phénylalanine.

Au moment où nous avons effectué ce travail, une autre méthode d'isolement du tRNA^{Phe} de levure avait été décrite par HOSKINSON et KHORANA (1965). Elle nécessite trois distributions successives en contre-courant dans des conditions différentes, avec respectivement 200, 780 et 1 200 transferts. La pureté obtenue atteignait 80 p.100 et le rendement était de 7 à 10 mg de tRNA^{Phe} pour 4 g de tRNA initial. Notre méthode est donc plus avantageuse puisqu'en une seule étape un excellent degré de pureté peut être atteint avec un rendement de 20 mg de tRNA^{Phe} pour 1 g.

2) Isoleucine-tRNA

Nous avons également recherché la position des tRNA^{Ile} dans le profil de fractionnement obtenu par contre-courant. La figure 1 montre que l'on observe deux pics correspondant à ces tRNA. Les degrés de pureté de ces tRNA varient de 20 à 50 p. 100 selon les cas.

Au moment où nous avons commencé nos travaux, la mise au point de la technique de distribution des tRNA par contre-courant n'était pas encore terminée et les premiers résultats de purification des tRNA^{Ile} avaient été moins encourageants que ceux obtenus par la suite. Par contre, une autre technique avait été décrite par KATCHALSKI et coll. (1966) pour la purification du tRNA^{Val} de E. coli qui semblait conduire à un enrichissement important. Nous avons été amenés à étudier l'application, au tRNA^{Ile} de levure, de cette dernière technique.

CHAPITRE III

ESSAI DE PURIFICATION DE L'ISOLEUCINE-tRNA PAR LA TECHNIQUE DE KATCHALSKI

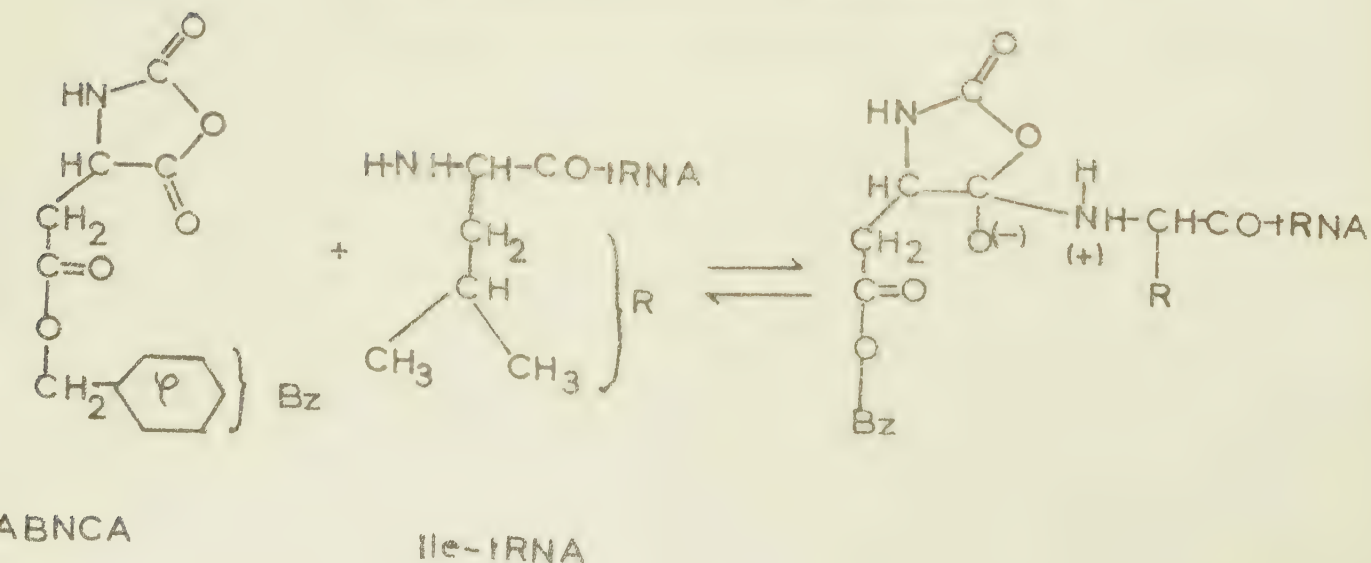
La méthode de KATCHALSKI et coll. (1966) a été décrite pour l'isolement du tRNA^{Val} de E. coli. Nous avons appliqué cette méthode à l'isolement du tRNA^{Ile} de levure.

I. PRINCIPLE DE LA METHODE

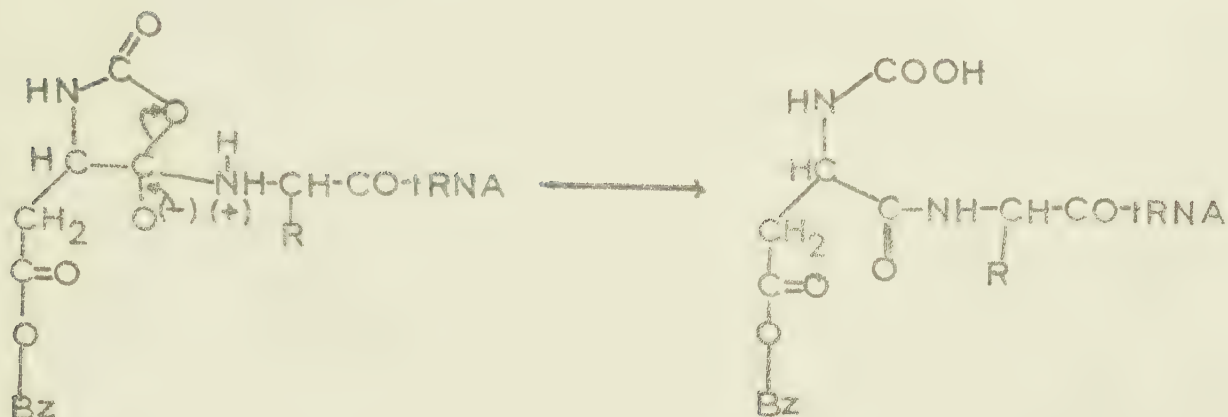
L'amine primaire aliphatique de l'isoleucine fixée sur le tRNA sert d'initiateur à la polymérisation de l'anhydride du benzyl-N-carboxy-L-aspartate (anhydride de LEUCHS:ABNCA) dissous dans le dioxane. Le poly-β-benzylaspartate (PBA) et le PBA-isoleucyl-tRNA coprécipitent. Le tRNA non chargé ne réagit pas et reste en solution.

II. MECANISME REACTIONNEL

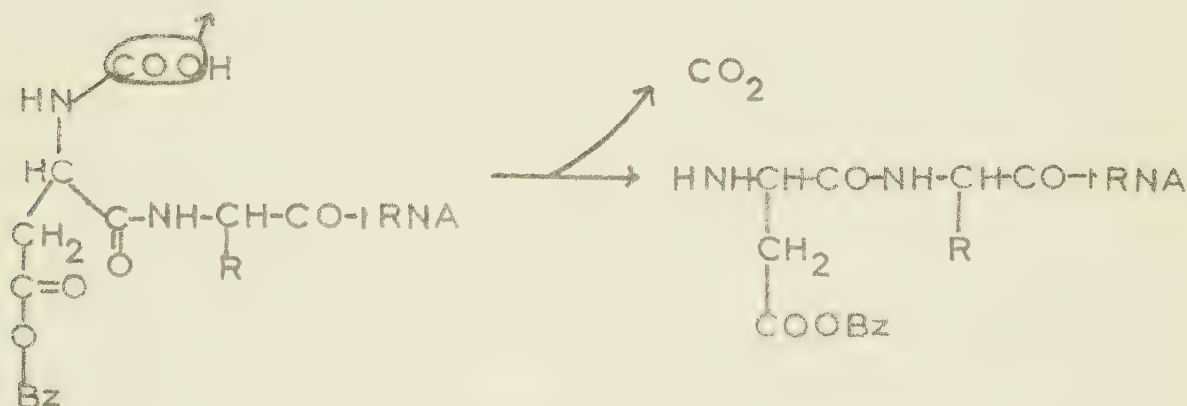
- 1) L'initiateur s'additionne sur le carbonyle-5 d'une molécule d'ABNCA avec formation d'un dimère activé



2) Décomposition de ce dimère en acide carbamique instable



3) Décarboxylation qui donne lieu à la formation de l'amide de l'acide aminé

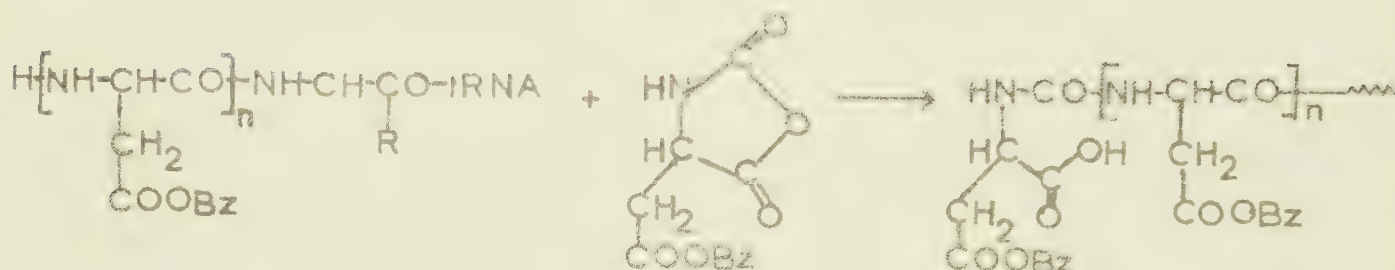


Ensuite la réaction se poursuit par un mécanisme analogue. La fonction amine du dimère obtenu se fixe sur le carbonyle-5 d'une nouvelle molécule d'ABNCA avec régénération d'un groupement amine terminal.

4) Fin de la réaction

Un groupement amine peut se fixer sur le carbonyle-2 d'une

molécule d'ABNCA. L'extrémité acide carboxylique formée ne permet plus la propagation de la réaction.



PBA - Ile - tRNA

III. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons utilisé du tRNA provenant de deux sources différentes : un tRNA de levure de boulangerie préparé selon la technique de MONIER et coll. (1960) et un tRNA de levure de bière (BOEHRINGER).

1) Préparation du tRNA de levure de boulangerie

Elle a été décrite par WEIL (1964). Nous l'avons complétée par un traitement phénolique dans le but de débarrasser le tRNA des protéines qui le contaminent encore et qui gênent la polymérisation. Nous avons fait subir au tRNA une double extraction phénolique dans les conditions indiquées par KATCHALSKI. Un volume de tRNA (5 mg/ml) est agité à 20° en présence de :

- 0,2 volume NaClO_4 5 M (MERCK)
- 0,5 volume phénol 80 p.100 (PROLABO)
- 0,1 volume chloroforme (PROLABO)

Après centrifugation, la phase supérieure est à nouveau traitée dans les mêmes conditions et précipitée à l'alcool. Le précipité

dissous dans $\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$ est dialysé contre $\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$.

Le perchlorate de sodium à forte concentration permet de détacher les protéines du tRNA, le chloroforme les émulsionne. Ces deux actions combinées permettent une meilleure élimination des protéines. Le tRNA de levure de bière a subi également un tel traitement.

2) Dosage des protéines par la méthode au biuret

Le dosage des protéines contaminant le tRNA a été effectué selon la méthode au biuret (GORNALL et coll., 1949).

0,5 ml d'une solution renfermant environ 25 μg de protéines sont précipités par 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Après 30 minutes de précipitation à 4°, le précipité est séché et dissous dans 0,6 ml d'eau distillée. On ajoute alors 0,3 ml de réactif au biuret. La réaction se poursuit pendant 30 minutes à température ordinaire et le dosage se fait par lecture de l'absorption à 310 m μ et à 390 m μ contre un témoin.

3) Préparation de l'isoleucyl-tRNA

La technique est décrite dans le chapitre VII.

4) Polymérisation

Nous tenons à remercier Monsieur SPACH qui nous a fourni gracieusement l'ABNCA.

A 1 ml d'une solution aqueuse d'isoleucyl-tRNA sont ajoutés 0,04 ml de NaHCO_3 0,5 M et 50 mg d'ABNCA dissous dans 0,6 ml de dioxane. La réaction se poursuit pendant 2 heures à 0°.

5) Elimination des tRNA libres

Le précipité obtenu est centrifugé pendant 30 minutes à 17 000 tours/minute et lavé trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer le tRNA non chargé qui aurait été entraîné.

Nous avons suivi la radioactivité des eaux de lavage qui correspondent et à l'aminoacyl-tRNA n'ayant pas réagi avec l'ABNCA et au peptidyl-tRNA n'ayant pas précipité.

6) Elimination du PBA

Pour séparer les deux constituants (peptidyl-tRNA et PBA libre), le précipité lavé est dissous dans 1,5 ml de phénol à 80 p.100 à 20°. Dans certains cas, pour obtenir une solubilisation complète, la solution doit être chauffée très rapidement à 37°. A cette solution limpide sont ajoutés 1,5 ml d'eau, 0,15 ml de NaClO_4 et 0,15 ml de chloroforme. Le milieu réactionnel est agité à 20° pendant 30 minutes puis centrifugé. La phase inférieure phénolique est lavée deux fois avec 1,5 ml d'eau. La phase aqueuse et les eaux de lavage sont rassemblées et dialysées pendant 48 heures à 4° contre 2 litres de NaCl 0,005 M. Les eaux de dialyse sont changées deux fois.

Cette extraction phénolique permet de séparer le PBA libre soluble dans le phénol, du PBA-isoleucyl-tRNA soluble dans l'eau. Cela permet de conclure que le PBA-isoleucyl-tRNA est adsorbé par le PBA libre au cours de la polymérisation. C'est pour cette raison qu'il précipite alors que normalement il est soluble dans l'eau.

7) Régénération du tRNA

Pour isoler le tRNA^{Ile} à partir du polypeptide, le PBA-isoleucyl-tRNA est traité par :

0,1 volume de pronase à 10 mg/ml (CALBIOCHEM)

0,1 volume de Tris-HCl 1 M pH 8,8

pendant 4 heures à 37°.

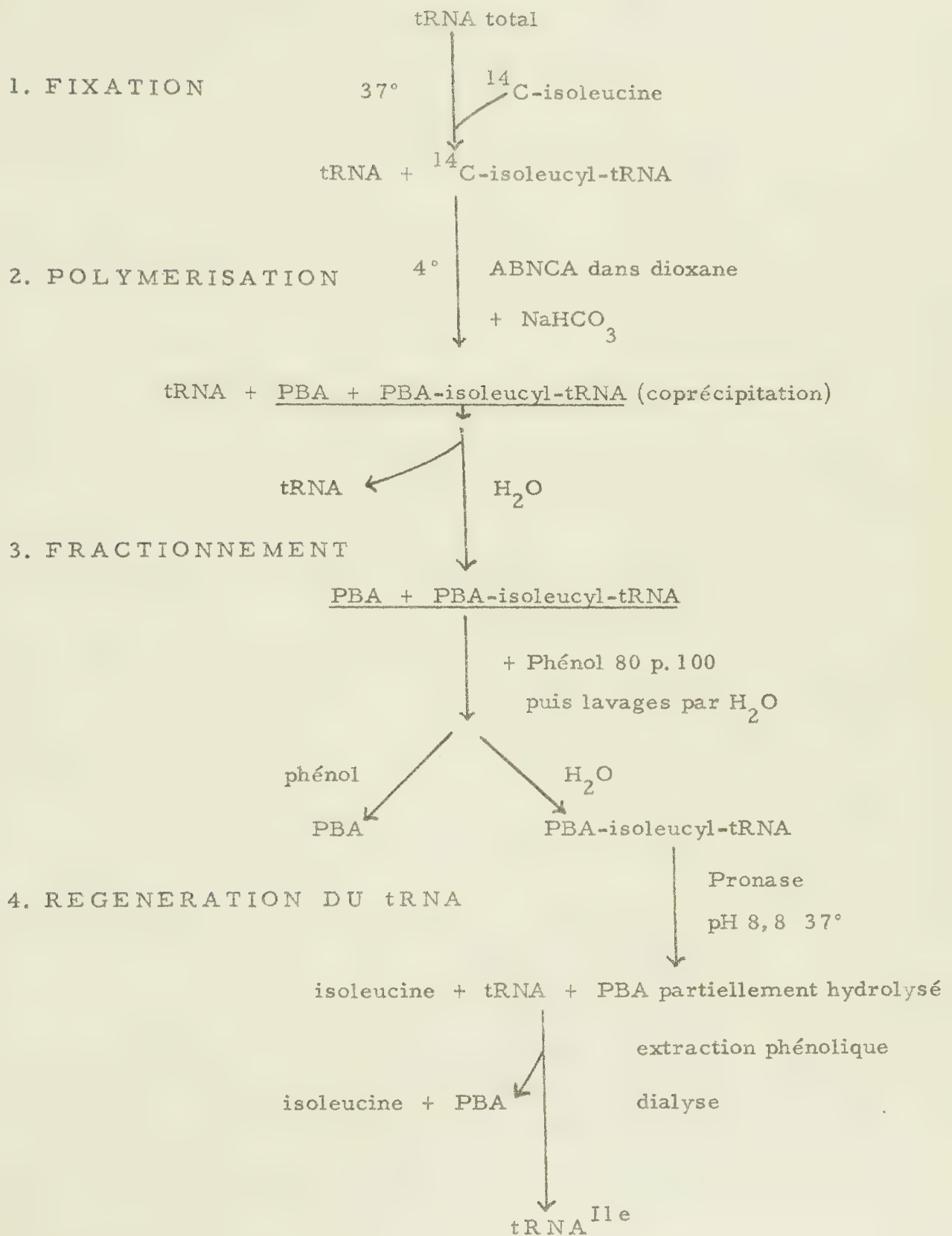
La réaction est stoppée par addition de :

0,75 volume de phénol 80 p.100

0,1 volume de NaClO_4 5 M

0,1 volume de chloroforme

Tableau I



Après 1 heure d'agitation à 20°, le mélange est centrifugé. La phase aqueuse est prélevée et traitée une nouvelle fois dans les mêmes conditions. La phase aqueuse est alors mise à dialyser pendant 48 heures contre NaCl 0,005 M à 4°.

On teste la capacité acceptrice du tRNA isolé de la même manière que pour le tRNA^{Phe}.

Les différentes étapes de cette technique ont été résumées dans le tableau I.

IV. RESULTATS

Nous étudierons successivement les résultats obtenus dans l'étape de polymérisation avec formation de PBA-isoleucyl-tRNA puis dans celle de la récupération du tRNA^{Ile} à partir de ce complexe.

1) Etude de l'enrichissement en tRNA^{Ile} sous forme de PBA-isoleucyl-tRNA

Les conditions décrites par KATCHALSKI et coll. (1966) pour le tRNA^{Val} d'E. coli ont été transposées à l'isolement du tRNA^{Ile} de levure. Les conditions expérimentales relatées précédemment nous ont servi de point de départ. Nous avons été amenés à effectuer une étude systématique de certains facteurs pour tenter d'améliorer la technique.

Les résultats sont consignés dans les tableaux II et III.

a - Influence du rapport concentration en ABNCA / concentration en aminoacyl-tRNA

Nous avons opéré de deux manières différentes :

- La concentration de l'ABNCA restant constante, nous avons fait varier la concentration en ¹⁴C-isoleucyl-tRNA. Nous constatons que pour une quantité d'ABNCA égale à 100 mg, la concentration en ¹⁴C-isoleucyl-tRNA peut varier du simple au triple sans que la purification du

TABLEAU II

CONDITIONS EXPERIMENTALES						RESULTATS	
Exp.	fixation en mM Ileu/mg de tRNA	mM isoleucyl -tRNA/ml H ₂ O	mg ABNCA dans 0,6 ml dioxane	mg ABNCA /mM isoleucyl -tRNA	% pertes aux lavages	mM Ileu/ mg tRNA	purifi- cation
1	1,1	9,95	50	5	-	3,1	2,8
2	1,1	9,95	50	5	-	2,9	2,6
3	1,9	13,86	100	7,2	-	13,2	6,9
4	2,44	19,9	100	5	57,1	14,4	5,9
5	2,44	14,9	100	6,7	53,2	14,19	5,8
6	2,44	10,08	100	9,9	48,6	15,12	6,2
7	2,44	6,07	100	16,5	47,9	14,47	5,9
8	2,44	9,05	150	16,6	49,9	15,34	6,3
9	0,6	8,37	150	17,9	-	3,7	6,0

TABLEAU III

CONDITIONS EXPERIMENTALES					RESULTS		
Exp.	fixation en mM Ileu/mg de tRNA	mM isoleucyl -tRNA, ml H ₂ O	mg/ABNCA dans 0,6 ml dioxane	mg ABNCA /mM isoleucyl -tRNA	% pertes aux lavages	mM Ileu/ mg tRNA	purifi- cation
10	1,12	13,28	75	5,65	52	8,48	7,7
11	1,12	13,28	100	7,53	54	8,22	7,5
12	1,12	13,28	150	11,29	59	8,57	7,8
13	1,12	13,28	200	15,06	55	8,10	7,4
14	1,12	13,28	200/0,9	15,06	45	8,43	7,6
15	1,67	14,34	100	6,97	59	10,96	6,5
16	1,45	9,27	75	7,73	64	12,38	8,5
17	1,45	9,27	75	7,73	64	12,17	8,4
18	0,88	8,7	75	8,56	70	6,98	7,9
19	0,88	8,7	75	8,56	60	7,3	7,2

tRNA obtenu ne soit améliorée (expériences 4 à 7, tableau II). Le PBA-isoleucyl-tRNA est purifié environ 6 fois. Par contre, on observe une différence au niveau des pertes durant les lavages donc du rendement de la préparation. Celui-ci est d'autant plus élevé que la concentration en ^{14}C -isoleucyl-tRNA est plus faible.

- Si nous faisons varier la concentration en ABNCA, tout en gardant constante la concentration en ^{14}C -isoleucyl-tRNA, nous n'observons aucune variation ni dans le taux de purification du tRNA isolé, ni dans le rendement final obtenu (expériences 10 à 13, tableau III).

Ces expériences nous permettent de conclure que le rapport ABNCA / ^{14}C -isoleucyl-tRNA ne joue un rôle sur le rendement que par l'intermédiaire du ^{14}C -isoleucyl-tRNA. Autrement dit, la concentration en ABNCA n'intervient ni dans le rendement de la réaction, ni dans le taux de purification à partir du moment où le réactif est en excès. Par contre, la concentration du ^{14}C -isoleucyl-tRNA, en présence d'un excès de réactif polymérisant, affecte le rendement de la préparation.

L'expérience 14, où le volume réactionnel a été augmenté (0,9 ml de dioxane au lieu de 0,6 ml), semble confirmer l'effet favorable de dilution dans ce processus.

b) Influence de la concentration en protéines

La contamination du tRNA en protéines joue un rôle important dans le rendement de la réaction. En effet, les fonctions amines des protéines sont aussi susceptibles de servir d'initiateur à la polymérisation de l'ABNCA. Ceci a été démontré clairement par les expériences 1 et 2 (tableau II). Le taux de purification obtenu pour le tRNA est très faible bien que les conditions expérimentales aient été voisines de celles employées dans les expériences décrites précédemment. La seule différence résidait dans le fait que le tRNA utilisé n'avait pas subi le traitement phénol-chloroforme-perchlorate de sodium au préalable. Comme les protéines

peuvent entrer en compétition avec le ^{14}C -isoleucyl-tRNA dans la polymérisation de l'ABNCA, on pouvait se demander si l'addition d'un excès de réactif améliorerait le rendement de l'expérience. C'est ce que nous avons observé dans l'expérience 3 où l'emploi d'une quantité supérieure d'ABNCA se traduit par une amélioration du taux de purification qui devient comparable à ceux obtenus auparavant. Dans toutes les autres expériences (4 à 19), nous avons toujours utilisé du tRNA ayant subi le traitement préalable phénol-chloroforme-perchlorate de sodium. Ce tRNA ne renfermait plus que 2 p. 100 de protéines dosées par la méthode au biuret.

c - Influence du taux de fixation de l'isoleucine au départ

Ce facteur joue un rôle important (figure 2). En fait, la fixation de départ conditionne la suite des opérations et il serait intéressant de pouvoir l'améliorer en utilisant soit des enzymes spécifiques, soit du tRNA partiellement purifié.

Nous avons essayé d'obtenir des conditions optimales de fixation en employant la préparation enzymatique décrite précédemment.

- Influence de la concentration en protéines enzymatiques sur la fixation de l'isoleucine

La figure 3 montre la variation de la fixation de l'isoleucine en fonction de la concentration en protéines enzymatiques. Il en résulte que la concentration optima à utiliser est de 2,5 mg pour 10 mg de tRNA total.

- Essai de décontamination des traces de nucléases

Afin d'améliorer la fixation de l'isoleucine sur le tRNA, nous avons essayé de débarrasser l'enzyme de toutes les traces de nucléases qui pouvaient le contaminer. Nous avons appliqué, sur notre préparation enzymatique retirée de la levure de boulangerie (FALA), la méthode d'élimination des nucléases employée par KATCHALSKI et coll. sur un enzyme de E. coli.

Figure 2 - INFLUENCE DU TAUX DE FIXATION SUR LA POLYMERISATION

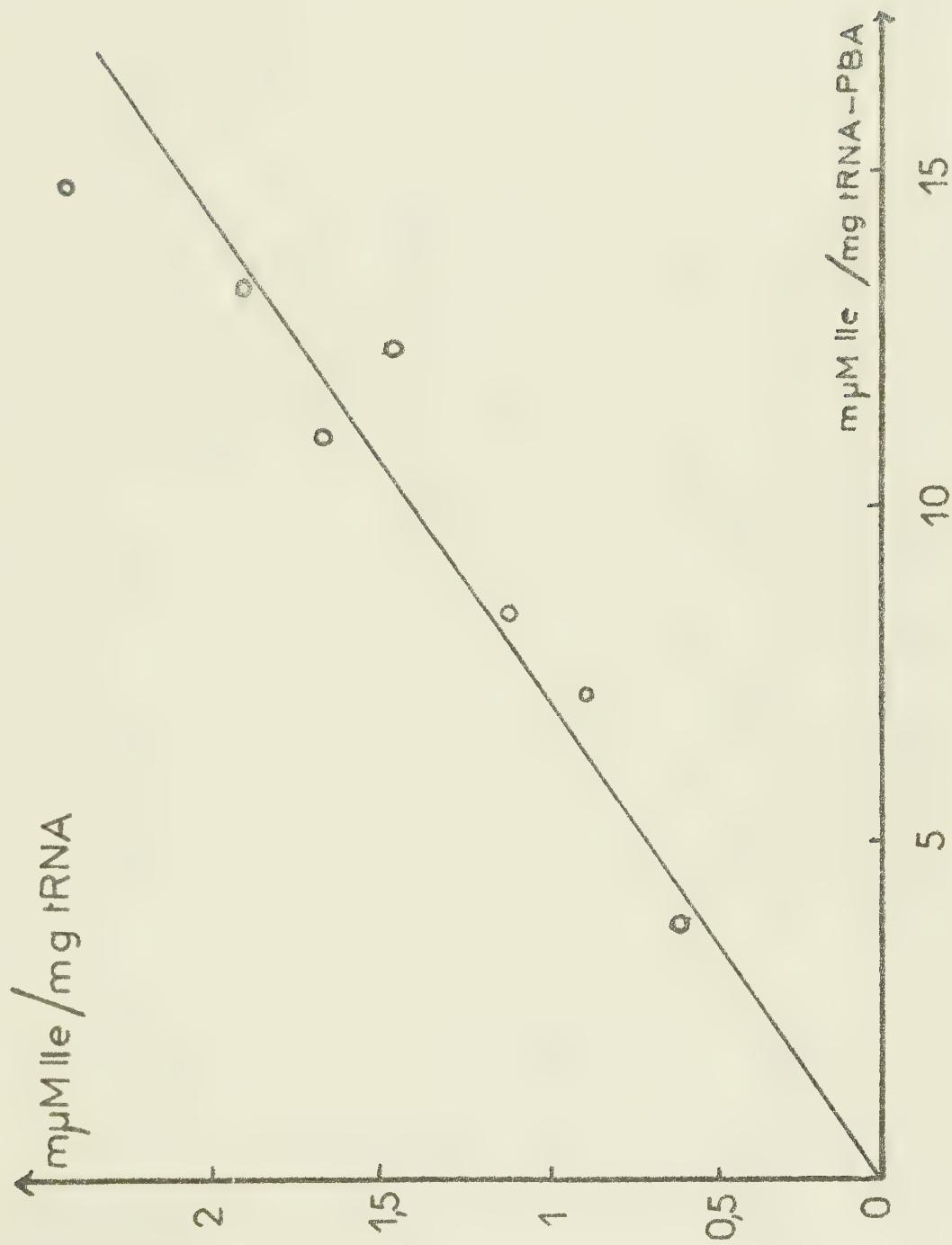
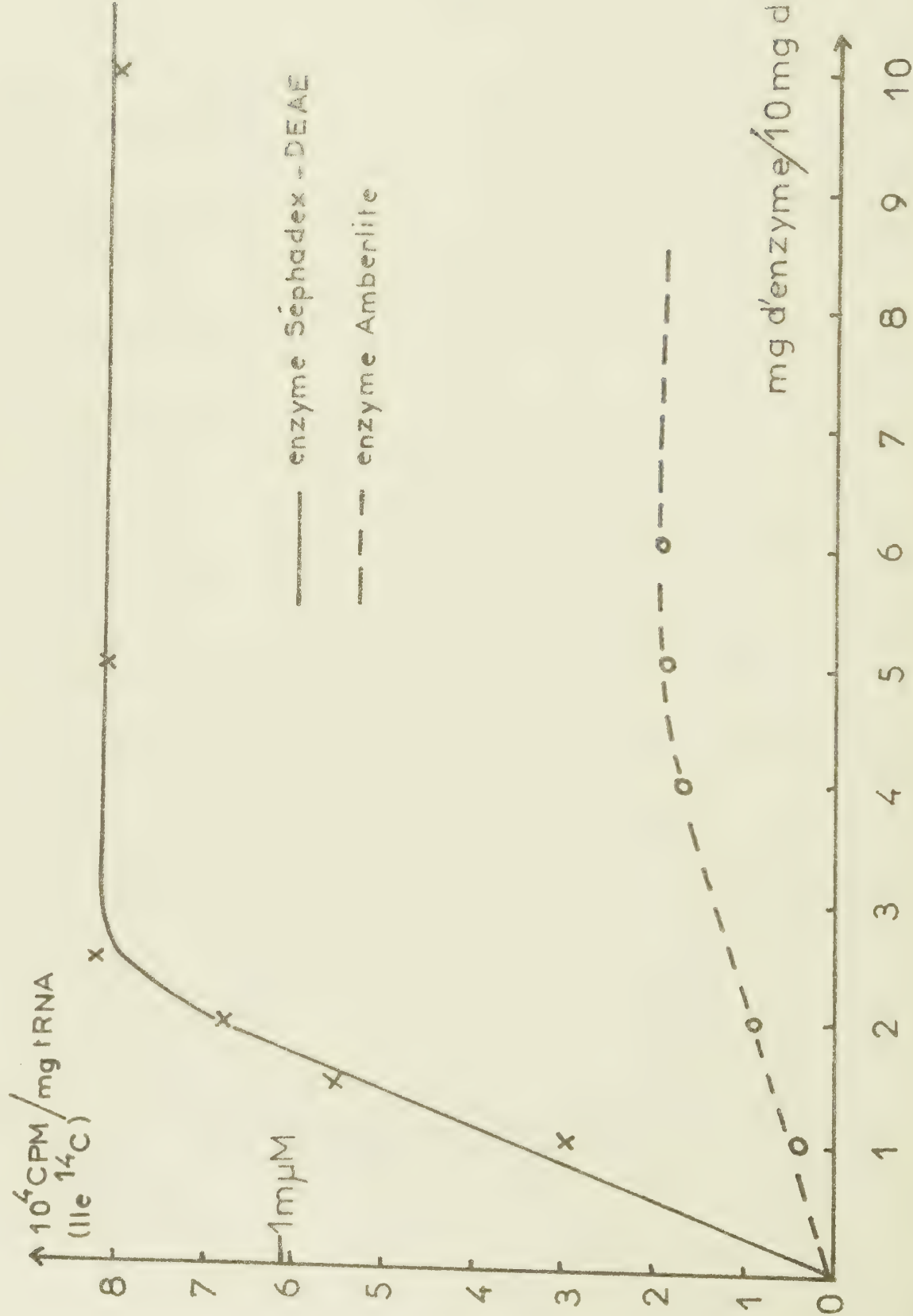


Figure 3 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ENZYME SUR LA FIXATION DE L'ISOLEUCINE



Cette technique repose sur le fait que les RNases renferment un taux élevé d'acides aminés basiques et peuvent être ainsi retenues sur une colonne échangeuse de cations. Nous avons employé une colonne d'Amberlite CG 50 type II ($^+H, RCOO^-$) équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 0,02 M pH 6,4 et éluée avec ce même tampon. Pour appliquer cette technique, nous avons été amenés à modifier la méthode de préparation enzymatique. Après centrifugation à 105 000 g de l'extrait brut et son passage sur DEAE-cellulose, on ajoute goutte à goutte à la fraction recueillie, un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Après 30 minutes de précipitation à 4°, le précipité est recueilli par centrifugation et dissous dans un minimum de tampon phosphate 0,02 M pH 6,4. Cette solution est ensuite passée sur la colonne d'Amberlite précédente.

L'enzyme ainsi préparé a été testé dans les mêmes conditions que l'enzyme Sephadex. Nous constatons (figure 3) que la préparation enzymatique est pratiquement inactivée. En effet, la fixation maxima obtenue avec l'enzyme Sephadex est 4 fois plus importante qu'avec l'enzyme Amberlite. De plus, pour obtenir le palier de fixation maxima, il faut 1,5 mg d'enzyme Sephadex pour 5 mg de tRNA, alors qu'il faut le double d'enzyme Amberlite pour la même quantité de tRNA. La décontamination des nucléases décrite par KATCHALSKI et coll. pour l'enzyme de E. coli n'a donc pas donné de bons résultats avec l'enzyme de la levure et nous ne l'avons pas appliquée.

2) Régénération du tRNA^{Ile} à partir du PBA-isoleucyl-tRNA

a - Elimination des traces de RNase contenues dans la pronase

Dans les premières expériences où nous avons suivi exactement les conditions exposées par KATCHALSKI et coll., nous avons constaté une complète inactivation du tRNA^{Ile}. Des tests ont montré que la pronase était en grande partie responsable de cette inactivation, probablement par

suite de contamination par des nucléases. Aussi, nous avons cherché à débarrasser la pronase de toutes traces de RNase. Dans ce but, KATCHALSKI et coll. préincubaient leur échantillon de pronase pendant 1 heure à 37°. Comme ce traitement ne semblait pas suffisant, nous avons effectué une étude en fonction du temps de préincubation et nous avons testé l'inactivation du tRNA par des pronases préincubées pendant des temps différents (figure 4). Il s'est avéré nécessaire de débarrasser complètement la pronase de la RNase qui la contaminait : un tRNA, mis en contact pendant 4 heures à pH 8,8 en présence de pronase préincubée 5 heures, possède la même capacité acceptrice qu'un tRNA non traité par cet enzyme.

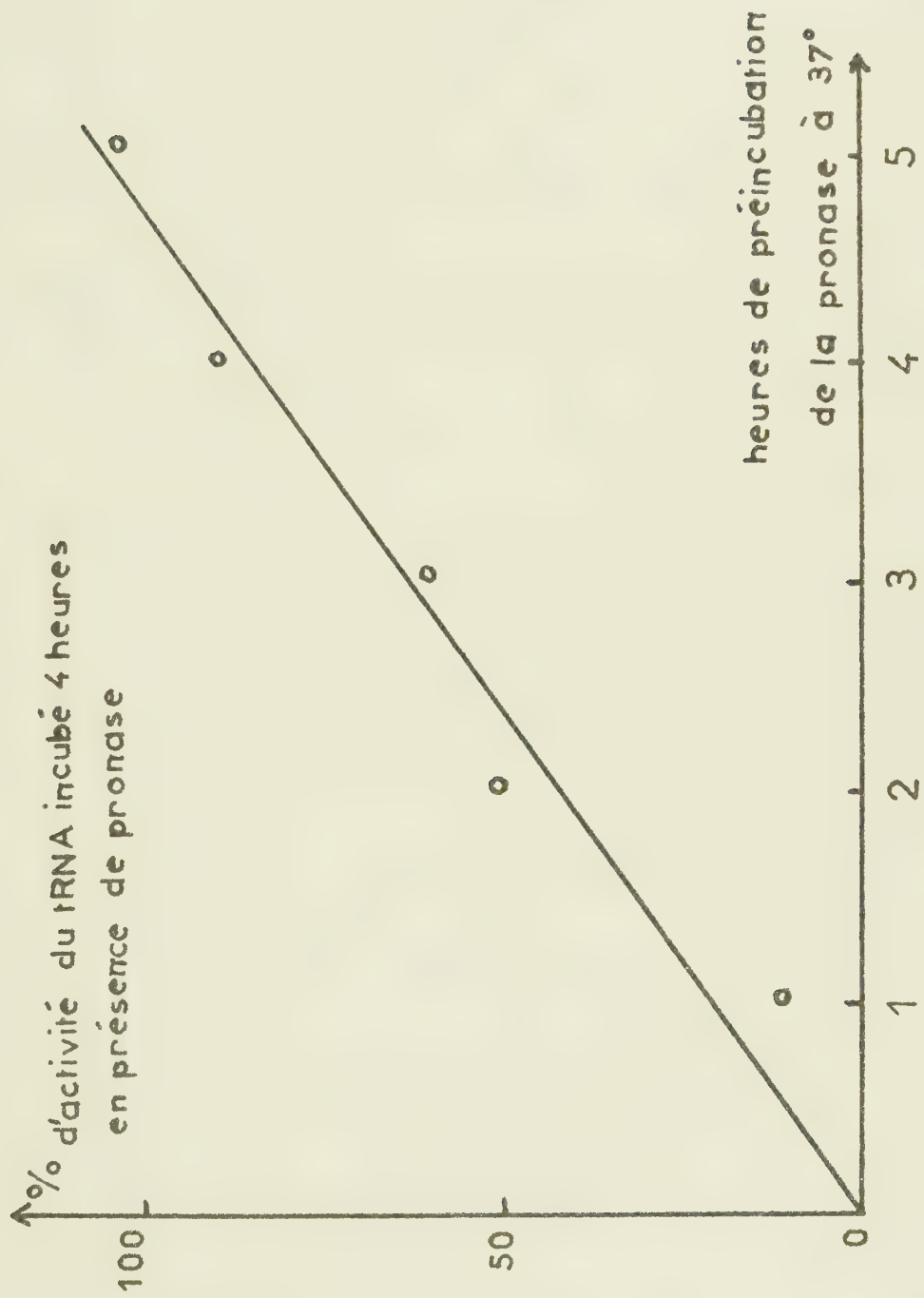
Dans ces conditions, la pronase détache environ 95 à 99 p.100 du peptide initial, ce qui concorde avec les résultats indiqués par KATCHALSKI.

b - Taux de purification final et activité biologique du tRNA préparé

Après action de la pronase, nous avons récupéré un tRNA qui s'est révélé être 3 à 4 fois plus actif qu'un tRNA non traité et testé dans les mêmes conditions.

Ce taux de purification est donc inférieur au taux d'enrichissement en PBA-isoleucyl-tRNA, calculé avant l'action de la pronase (environ 8 fois dans les échantillons 10 à 19). Il semble donc que les traitements subis par le tRNA après la fixation de l'acide aminé et nécessaires à la régénération provoquent une perte d'activité biologique. Mais, il ressort des études faites sur la pronase que l'incubation à 37° et à pH 8,8 pendant 4 heures n'est pas responsable de cette inactivation. Il faut donc admettre que la cause de ce phénomène se situe à un niveau précédant cette étape, probablement l'étape de polymérisation. On pourrait penser que l'inactivation pouvait être due à un changement dans la configuration tertiaire du tRNA, mais un essai de renaturation dans les conditions de LINDAHL et coll. (1966) (chauffage à 60° pendant 5 minutes en présence de $Mg^{++} 10^{-2} M$) s'est soldé par un résultat négatif.

Figure 4 - INFLUENCE DE LA PRONASE SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DU tRNA



V. RENDEMENT DE LA PREPARATION

Nous avons récupéré, sous forme de tRNA enrichi 3 à 4 fois en tRNA^{Ile}, 1 à 2,5 p.100 du tRNA initial. Pour obtenir un tRNA^{Ile} en quantités préparatives et non analytiques, il faut donc traiter de grandes quantités de tRNA, ce qui cause de nombreuses difficultés ainsi que nous l'avons constaté. En effet, dans les cinq dernières expériences (15 à 19), nous avons essayé de reproduire cette technique en "grand" (sur 300 mg de tRNA). Nous avons éprouvé des difficultés d'ordre technique pour réaliser ces expériences et il semble que le rendement de la polymérisation s'en soit affecté.

VI. DISCUSSION

Nous avons essayé d'appliquer à un tRNA^{Ile} de levure, la méthode mise au point par KATCHALSKI et coll. (1966) pour un tRNA^{Val} de E. coli. Mais en appliquant strictement les conditions décrites par ces auteurs, nous n'avons obtenu qu'un très faible enrichissement en tRNA^{Ile}. Ce résultat nous a amené à étudier systématiquement les conditions de polymérisation.

Nous avons constaté qu'un excès d'ABNCA n'apportait aucune amélioration du taux de purification ou du rendement de la préparation, mais que ce dernier paraissait sensible à la concentration en ¹⁴C-isoleucyl-tRNA. Nous avons également dû modifier les conditions de la régénération du tRNA^{Ile} à partir du PBA-isoleucyl-tRNA. En effet, la pronase inactivait le tRNA, probablement, par suite d'une contamination par des nucléases. Nous avons été conduits à prolonger le temps de préincubation de la pronase à une durée de 5 heures afin d'éliminer toutes traces de RNase.

Nous avons enfin constaté que la présence de protéines ou d'acides aminés diminuait le rendement de la réaction. C'est pourquoi, le tRNA ne doit pas être souillé de protéines et la fixation de l'isoleucine doit être réalisée dans les meilleures conditions.

D'une façon générale, nous avons enrichi le tRNA^{Ile} de 6 à 8 fois en PBA-isoleucyl-tRNA, mais nous n'avons récupéré qu'une partie de cette activité biologique après régénération du tRNA^{Ile}. Il y a donc eu une inactivation du tRNA, probablement lors de l'étape de la polymérisation. Cette dénaturation représente un assez grave inconvénient à l'emploi de cette méthode. Nous avons finalement obtenu un tRNA dont l'activité acceptrice vis-à-vis de l'isoleucine est 3 à 4 fois plus importante que celle d'un tRNA non traité.

Il semble que nous ayons atteint, dans ces conditions, un degré maximum de purification puisque les résultats obtenus étaient reproductibles. Afin d'améliorer l'emploi de cette technique, il serait intéressant, voire indispensable, d'utiliser des enzymes spécifiques et des tRNA partiellement purifiés.

Il faut cependant remarquer que des résultats, obtenus depuis l'exécution de notre travail, ont montré que par la technique de distribution en contre-courant on pouvait obtenir, en une seule étape, un tRNA^{Ile} possédant un degré de pureté qui, dans les circonstances les moins favorables, était au moins équivalent et, en général, nettement supérieur (54 p. 100) à celui trouvé par la méthode de KATCHALSKI. De plus, la technique de fractionnement par contre-courant permet de préparer des quantités de tRNA purifiés beaucoup plus importantes.

Au moment où nous avons eu besoin, pour nos recherches, de tRNA^{Ile} enrichi, la technique de fractionnement par contre-courant, pour le tRNA^{Ile}, n'était pas encore complètement mise au point, alors que l'étude de l'application, au tRNA^{Ile} de levure, de la méthode de KATCHALSKI était terminée. Aussi avons-nous utilisé cette dernière méthode pour préparer quelques fractions de tRNA fixant 3 à 4 fois plus d'isoleucine que le tRNA initial pour pouvoir étudier les modifications entraînées par la bromuration du complexe ribosomes - poly U - isoleucyl - tRNA.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CONFORMATION DES tRNA PAR DICHROISME CIRCULAIRE

CHAPITRE IV

ETAT ACTUEL DU PROBLEME DE LA CONFORMATION DES tRNA

Nous avons vu que l'un des problèmes fondamentaux de la biologie moléculaire était d'étudier les relations entre les structures et les activités biologiques des tRNA. La connaissance de la conformation de ces molécules est donc importante dans l'étude de ce problème. Des progrès considérables ont été réalisés dans la détermination de leurs structures durant ces dernières années. Rappelons que la séquence des bases de plusieurs tRNA a été déterminée récemment (voir introduction générale). La comparaison de ces structures permet de mettre en évidence 6 régions présentant des caractéristiques communes (figure 5). :

- une région (I) 5' terminale comprenant 8 nucléotides, le nucléotide terminal étant le plus fréquemment le nucléotide pG ;
- une région (II) renfermant 17 à 19 nucléotides qui est riche en dihydrouracile (H_2U) dans les tRNA de levure, mais cette base est absente dans les tRNA de E. coli ;
- une région (III) de 17 à 18 nucléotides renfermant le triplet anticodon ;

- une région (IV) de longueur et de séquence variables, constituée de 3 à 13 nucléotides ;
- une région (V) de 17 à 19 nucléotides, caractérisée par la séquence commune Gp-Tp- ψ p-Cp-Pup-A (ou MeA) ;
- une région (VI) 3' terminale renfermant le triplet commun pCpCpA.

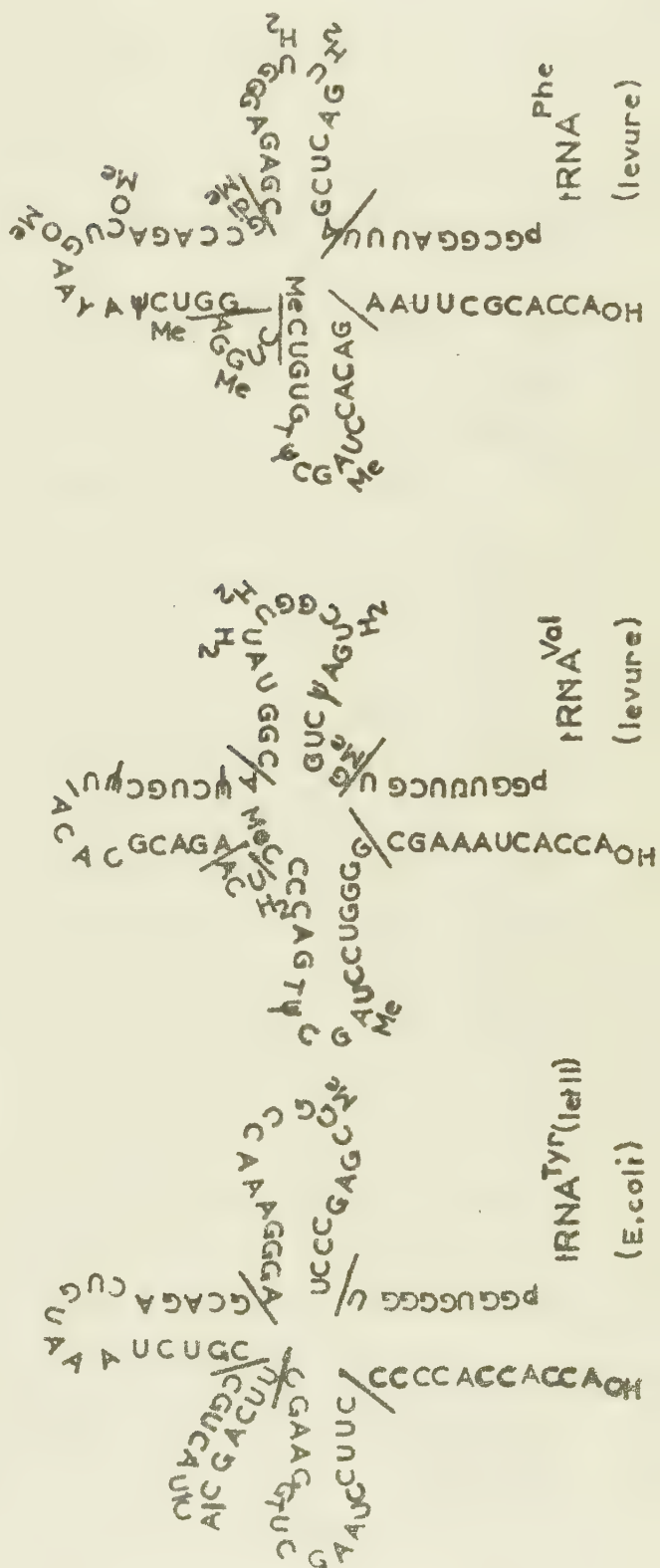
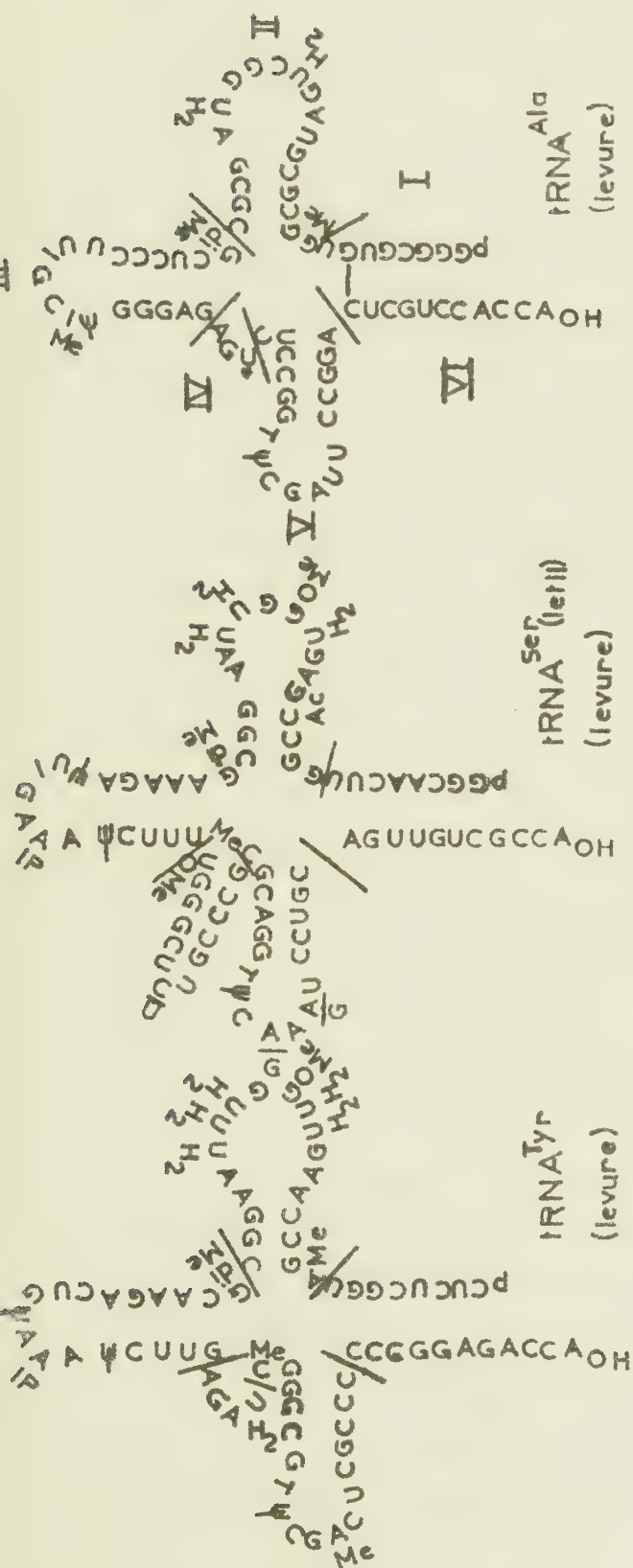
L'étude de la structure secondaire du tRNA a donné lieu à de nombreuses suggestions. Actuellement, il est admis que le tRNA est constitué par une chaîne polynucléotidique repliée sur elle-même pour former une double hélice. Les seules liaisons envisagées dans les premiers modèles (FRESCO et coll., 1960 ; BROWN et ZUBAY, 1960 ; FULLER, 1960 ; Mc CULLY et CANTONI, 1962) étaient des liaisons hydrogène permettant des appariements de bases semblables à ceux imaginés par WATSON et CRICK (1953) pour le DNA.

A la suite de la détermination de la séquence des bases du tRNA^{Ala}, HOLLEY et coll. ont proposé plusieurs modèles dont l'un, plus général, en feuille de trèfle semble pouvoir être appliqué à tous les tRNA isolés jusqu'à présent. Suivant ce modèle, la chaîne polynucléotidique du tRNA est repliée sur elle-même pour former une double hélice renfermant un maximum de liaisons hydrogène entre les bases A-U et G-C. Cette structure renferme un certain nombre de zones non appariées formant des boucles qui présentent de nombreuses similitudes dans les divers tRNA. (figure 5). Ces boucles se situent dans les régions II, III, IV et V décrites ci-dessus.

Plusieurs critiques peuvent être apportées à ce modèle. D'une part, des expériences de digestions enzymatiques partielles par la ribonucléase pancréatique et la ribonucléase T₁ (PENSWICK et HOLLEY, 1965 ; ARMSTRONG et coll., 1966 ; WAGNER et INGRAM, 1966 ; ZACHAU et coll., 1966 et BAEV et coll., 1966) ou de modifications chimiques (bromuration par la N-succinimide et désamination par l'acide nitreux (NELSON

Figure 1 displays the secondary structure of six tRNA molecules, labeled I through VI, showing their cloverleaf conformations and associated amino acids and sources.

- tRNA I (Ala, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.
- tRNA II (Glu, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.
- tRNA III (Ser, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.
- tRNA IV (Tyr, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.
- tRNA V (Phe, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.
- tRNA VI (Val, levure):** Accepter stem: 5'-GGGAG-3'; TΨC loop: 3'-UCCG-5'.



et coll., 1967) ; action de la 1-cyclohexyl-4(2 morpholinyl-4 éthyl) carbo-diimide (BROSTOFF et INGRAM, 1966) ; action de l'acrylonitrile (YOSHIDA et UKITA, 1965) ont été effectuées dans le but de localiser les zones accessibles à ces agents et de tester la réalité du modèle en feuille de trèfle. Les résultats obtenus ne sont pas incompatibles avec ce modèle, mais ils mettent en évidence des différences de réactivité entre les diverses régions en boucle de ce modèle. La région III de l'anticodon apparaît comme très réactive. La région II (riche en H_2U chez les tRNA de levure) et la région du triplet pCpCpA sont également facilement accessibles. Mais, la région V renfermant la séquence Gp-Tp- ψ p-Cp ne montre qu'une très faible réactivité.

D'autre part, les seules liaisons envisagées dans ce modèle sont des liaisons hydrogène permettant des appariements de bases semblables à ceux démontrés par CRICK et WATSON pour le DNA à l'état solide (fibre). En solution, l'existence d'une structure en double hélice pour le DNA a été souvent déduite des expériences de dénaturation thermique qui ont mis en évidence une forte hyperchromicité et un processus de "fusion" coopératif. Mais, cette variation en fonction de la température des propriétés optiques (densité optique, dispersion optique rotatoire ou dichroïsme circulaire) des polynucléotides ou des acides nucléiques ne peut être attribuée uniquement à la rupture des liaisons hydrogène entre bases complémentaires. En effet, ce phénomène a été observé également sur des polynucléotides en simple hélice tels que le poly C (FASMAN et coll., 1964), le poly A en milieu neutre (HOLCOMB et TINOCO, 1965) et même sur des oligonucléotides par WARSHAW et TINOCO (1965) et STANLEY et BOCK (1965). En outre, LIPSETT (1964) a mis en évidence l'existence d'aggrégats entre homopolymères guanyliques et il est difficile d'admettre que de telles liaisons G-G ne sont pas possibles dans un tRNA. WITZ, HIRTH et LUZATTI (1965) ont montré, dans une étude de diffraction des rayons X aux petits angles, que le RNA de TYMV et le RNA de TMV ont des structures analogues en solution, alors qu'il existe probablement moins de liaisons A-U et G-C

dans le RNA de TYMV que dans le RNA de TMV. Tous ces résultats expérimentaux laissent supposer qu'il existe, pour stabiliser la structure des polynucléotides et des acides nucléiques, d'autres liaisons que des liaisons hydrogène entre A-U et G-C. Les études théoriques de ZIMM et KALLENBACH (1962) et de DE VOE et TINOCO (1962) suggèrent la présence d'interactions entre les bases situées dans des plan parallèles. BRAHMS (1963 et 1964) a montré, par dichroïsme circulaire, que certains polynucléotides (poly A, poly U et poly C à pH neutre) pouvaient posséder une structure ordonnée autre que la structure en double hélice. Ces résultats démontrent l'existence d'un processus non coopératif de dénaturation thermique qui a permis d'obtenir des valeurs thermodynamiques sur des homopolymères adényliques en l'absence de liaisons hydrogène. En effet, la valeur d'énergie libre trouvée par BRAHMS et coll. (1966) pour les adénylates est favorable à une structure en simple hélice. Par des mesures de dichroïsme circulaire, ces mêmes auteurs ont montré que la structure en simple hélice serait stabilisée uniquement par des interactions entre bases parallèles du type de VAN der WAALS. En outre, BRAHMS et SADRON (1966) et BRAHMS et coll. (1967) suggèrent l'existence d'une liaison "verticale" entre les groupements 2'OH du ribose et un phosphate de la chaîne polynucléotidique. Par ailleurs, l'étude de la variation de la dispersion optique rotatoire d'un tRNA de E. coli par LAMBORG et coll. (1965), d'un tRNA de levure par FASMAN et coll. (1965) et d'un tRNA de germe de blé par KAY et OIKAWA (1966), au cours d'expériences réalisées en présence de formaldéhyde, d'urée ou d'autres agents susceptibles de dénaturer la conformation du tRNA a montré que la structure de ce dernier était stabilisée à la fois par des liaisons hydrogène et des interactions entre bases parallèles. MILLAR et Mc KENZIE (1967) ont abouti à des conclusions analogues en étudiant l'effet de la formaldéhyde sur les propriétés hydrodynamiques (viscosité, sédimentation) et optiques (polarisation de fluorescence) d'un tRNA de E. coli.

ENGLANDER et ENGLANDER (1965) ont montré par une étude d'échange de Tritium que le tRNA de levure renfermait un pourcentage important de liaisons hydrogène : pourcentage supérieur à celui qui existerait si seules les liaisons hydrogène A-U et G-C étaient présentes.

Finalement, Mc DONALD et coll. (1965) par résonance magnétique nucléaire trouvent que le spectre du tRNA de levure ressemble à celui du poly A en milieu neutre, ce qui laisserait supposer que le tRNA posséderait une structure en simple hélice stabilisée par des liaisons dues à l'empilement des bases.

Toutes ces considérations ont conduit CANTOR et TINOCO (1965) à proposer pour le tRNA^{Ala} une structure légèrement différente de celle imaginée par HOLLEY et coll. (1965) et qui tient compte des liaisons hydrogène entre bases appariées A-U et G-C comme dans le modèle en feuille de trèfle et aussi des liaisons dues aux interactions entre les bases situées dans des plans parallèles. Ces auteurs ont calculé les spectres de dispersion optique rotatoire correspondant à cette structure. Leurs résultats sont en accord avec ceux trouvés expérimentalement par VOURNAKIS et SHERAGA (1966) pour le tRNA^{Ala} et le tRNA^{Tyr}.

L'ensemble de ces résultats démontre que le modèle de structure en feuille de trèfle est plausible, mais qu'il ne peut, à lui seul, expliquer toutes les propriétés du tRNA. L'existence d'une structure tertiaire permettrait d'expliquer certains de ces résultats, mais la réalité d'une telle configuration n'a pas encore été démontrée. LINDAHL et coll. (1966) et SUEOKA et coll. (1966) ont mis en évidence deux états conformationnels réversibles, l'un natif et biologiquement actif, l'autre dénaturé et inactif, respectivement chez divers tRNA de levure et de E. coli. ADAMS et coll. (1967) ont montré que ces deux formes possédaient des propriétés optiques, hydrodynamiques et chromatographiques différentes. La forme dénaturée est plus sensible à l'attaque par la RNase pancréatique (ADAMS et coll.) et par la polynucléotide phosphorylase (THANG et coll., 1967).

Plusieurs modèles, tous hypothétiques, ont déjà été proposés : l'un par CRAMER et coll. (1967) . Dans ce modèle, les bases Ψ -C de la séquence Gp-Tp- Ψ p-C de la région V sont appariées à la séquence A-G de la région II riche en H_2U et les bases G-C de cette même région avec la séquence C-C du triplet terminal CpCpA.

Une participation de ce triplet CpCpA à la structure tertiaire des tRNA est suggérée par les modifications du profil de dispersion optique rotatoire (SARIN et ZAMECNIK, 1965 ; STULBERG et ISHAM, 1967) et des propriétés de sédimentation (KAJI et TANAKA, 1967) observées soit après l'enlèvement ou oxydation, soit après élimination de l'adénosine terminale.

En conclusion, nous voyons que les résultats actuels ne permettent pas de proposer une structure définitive pour les tRNA. C'est pourquoi, Monsieur le Professeur EBEL m'a proposé d'entreprendre une étude sur la conformation des tRNA par des mesures de dichroïsme circulaire.

Les méthodes optiques telles que la dispersion optique rotatoire ou le dichroïsme circulaire (D. C.) présentent un grand intérêt dans l'étude de la structure des macromolécules car elles permettent de déterminer les arrangements spaciaux des résidus moléculaires en macromolécules. De ces deux techniques, la dispersion optique rotatoire est de loin la plus familière. Pourtant, le dichroïsme circulaire présente certains avantages. Il ne se manifeste que dans la région de la bande d'absorption alors que la dispersion optique rotatoire est un phénomène dispersif qui a lieu aussi bien au voisinage du maximum d'absorption que loin de ce maximum. Il devrait donc être possible de déterminer de manière plus précise le spectre de dichroïsme circulaire que le spectre de dispersion optique rotatoire. Ces deux phénomènes ont leur origine dans l'activité optique des molécules.

CHAPITRE V

THEORIE DU DICHROISME CIRCULAIRE

Nous savons que tout rayonnement lumineux est lié à la propagation d'un champ électrique $\vec{E}$ et d'un champ magnétique $\vec{M}$. Dans le cas d'une lumière polarisée, le champ $\vec{E}$ varie sinusoidalement dans un plan et le champ $\vec{M}$ oscille dans un plan perpendiculaire.

Quand l'onde lumineuse frappe une molécule, les électrons sont excités si la fréquence de la lumière incidente est la même que celle des électrons, c'est-à-dire, si elle satisfait aux conditions de la loi de PLANK : $\Delta E = h\nu$. Les électrons passeront alors à un niveau d'énergie supérieure : c'est le phénomène d'absorption.

Pour expliquer l'activité optique d'un milieu, FRESNEL a démontré qu'une onde plane polarisée rectilignement pouvait se décomposer en deux ondes polarisées circulairement en sens inverse et qui peuvent se propager à des vitesses différentes. Leur résultante fait alors un angle α avec le plan de polarisation incident. Comme la vitesse de propagation d'une onde lumineuse dans un milieu est reliée directement à l'indice de réfraction de ce milieu, on peut dire que le milieu possède des indices de réfraction différents pour les deux ondes. Il est dit optiquement actif : c'est le phénomène de biréfringence circulaire.

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_g - n_d)$$

où l est l'épaisseur du cristal

n_g et n_d sont les indices de réfraction du milieu pour les composantes gauche et droite de l'onde lumineuse.

Si les deux composantes se propagent non seulement à des vitesses différentes, mais sont en outre absorbées différemment, leur résultante

ne décrit plus un cercle mais une ellipse. L'onde lumineuse est polarisée elliptiquement : c'est le phénomène de dichroïsme circulaire (figure 6). Ce dernier est mesuré par la différence entre les coefficients d'absorption des vibrations circulaires gauche et droite :

$$\Delta \epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d$$

La relation entre l'ellipticité et cette différence est la suivante :

$$\varphi(\varphi) \approx (\varphi) \approx \frac{\pi}{\lambda} (\epsilon_g - \epsilon_d)$$

Origine du pouvoir rotatoire

Une molécule est douée de pouvoir rotatoire si sa structure possède une dissymétrie ; celle-ci peut être due à un carbone assymétrique ou à une dissymétrie hélicoïdale, cas des molécules biologiques qui nous intéressent plus particulièrement ici.

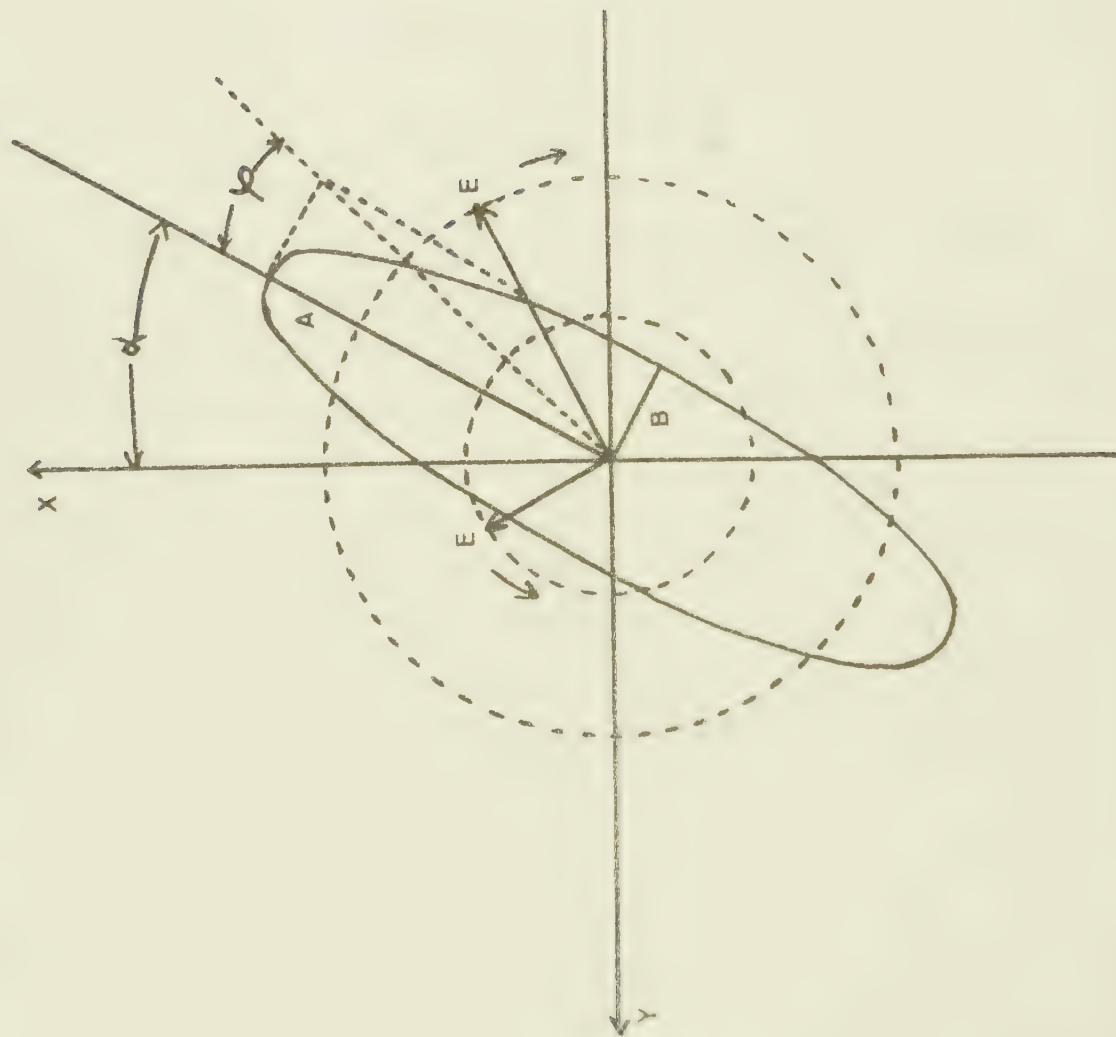
Si on soumet une molécule en hélice à une onde électromagnétique polarisée, il y a création d'un dipôle électrique induit et d'un dipôle magnétique induit. Le produit scalaire des vecteurs correspondant aux moments électrique ($\vec{\mu}$) et magnétique ($\vec{m}$) de ces deux dipôles représente une caractéristique du pouvoir rotatoire : la force rotatoire $\vec{R}$:

$$\vec{R} = |\vec{\mu}| \cdot |\vec{m}|$$

On peut montrer que si une molécule possède un centre de symétrie ou un plan de symétrie, la force rotatoire s'annule car soit l'un des moments dipolaires est nul, soit les deux moments dipolaires sont orientés perpendiculairement et leur produit scalaire est nul. La molécule est alors optiquement inactive.

L'onde lumineuse émergente d'une solution contenant la molécule hélicoïdale va avoir un vecteur électrique à deux composantes : l'une

Figure 6



parallèle au champ électrique initial et l'autre dans la direction du champ magnétique. Leur résultante est une onde polarisée dont le plan a tourné d'un angle α .

Dans la région spectrale éloignée d'une bande d'absorption la rotation, en fonction de la longueur d'onde λ , peut être définie par la relation classique de DRUDE :

$$(\alpha)_{\lambda} = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

où K est une constante,

λ_c est la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption,

ou par la relation de ROSENFELD établie sur la base de la mécanique quantique :

$$\alpha = \sum_i \frac{A_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente,

λ_i est la longueur d'onde associée à une transition électronique optiquement active,

A_i est une constante proportionnelle à la force rotatoire.

Chaque terme de la somme représente la contribution d'une seule transition

$$A_i = \frac{9600 \pi N R_i}{M h c}$$

où N est le nombre d'AVOGADRO

M est le poids moléculaire

h est la constante de PLANK

c est la vitesse de la lumière

R_i est la force rotatoire de la transition électronique.

La force rotatoire R_i s'obtient expérimentalement à partir des courbes de dichroïsme circulaire.

$$R_i = \frac{3hc \cdot 10^3 L_n 10}{32\pi^3 N} \int_0^\infty \frac{\epsilon_g - \epsilon_d}{v} dv$$

L'équation de DRUDE a été modifiée par MOFFIT (1956) dans le cas de la structure hélicoïdale des polypeptides. Il a introduit un terme semi-empirique B pour tenir compte de la structure secondaire :

$$\alpha = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_c^2} + \frac{B}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^2}$$

La théorie excitonique permet de mieux comprendre les propriétés optiques des polymères en hélice. MOFFIT (1956) et MOFFIT et KIRWOOD (1957) furent les premiers à l'appliquer à des polymères de nature protéique. Cette idée fut reprise et appliquée par TINOCO et coll. (1963).

Dans un polymère, la lumière n'est pas absorbée par le monomère isolé mais l'excitation par suite de l'interaction de résonance est distribuée sur un grand nombre de résidus.

Considérons le cas le plus simple d'un dimère, par exemple l'acide diadénylique ApA. Les électrons du chromophore d'un monomère sont en interaction coulombienne avec ceux de l'autre et vice et versa. Par suite de l'interaction, chaque bande d'absorption du monomère est dédoublée en deux bandes de fréquence :

$$\nu_1 = \nu_0 + \frac{V}{h}$$

$$\nu_2 = \nu_0 - \frac{V}{h}$$

où V est l'énergie d'interaction entre les voisins les plus proches,
 ν_0 est la fréquence d'absorption du monomère.

Les forces rotatoires des oligomères et des polymères peuvent être calculées par la formule générale de BRADLEY, TINOCO et WOODY (1963). Dans le cas simple du dimère ApA, elles peuvent être exprimées par l'équation simplifiée de VAN HOLDE et coll. (1965) :

$$R_1 = - \frac{\pi z}{2 \lambda_0} \mu^2 \sin \alpha$$

$$R_2 = + \frac{\pi z}{2 \lambda_0} \mu^2 \sin \alpha$$

où μ est la valeur du moment électrique de transition,

α est l'angle entre les moments de transition des deux bases,

z est la distance verticale entre les bases,

λ_0 est la longueur d'onde du maximum d'absorption dans le monomère.

Les forces rotatoires sont égales et de signe opposé.

α ne peut être égal à 0° ou à un multiple de 180° car R_1 et R_2 seraient nulles et il n'y aurait pas de pouvoir rotatoire.

En fait, les modèles étudiés montrent que α est compris entre 30° et 45° et que ApA peut être considéré comme le point de départ d'un polynucleotide en simple hélice.

Dans le cas le plus compliqué d'un polymère renfermant N monomères, chaque bande d'absorption de monomère est divisée en N bandes dont les fréquences peuvent être calculées par la théorie de BRADLEY et coll.

$$\nu_K = \nu_0 + \frac{2V}{h} \cos \frac{\pi K}{N+1} \quad K = 1, 2, \dots, N$$

L'expression de la force rotatoire correspondante, lorsque la bande d'absorption est perpendiculaire à l'axe de l'hélice, est la suivante :

$$R_K = - \frac{\pi Z \mu_1^2}{\lambda_0 (N+1)} \sum_{j=1}^N \sin \frac{\pi K_j}{N+1} \sin \frac{\pi K_j}{N+1} \sin(j-i) d$$

On peut appliquer cette formule à toute une série d'oligomères et prédire leur force rotatoire et leurs caractéristiques spectroscopiques du dichroïsme circulaire. Ainsi, pour toute une série d'oligoadénylates, il a été possible de prévoir la forme du spectre et de la relier à la structure. Le spectre présente une bande positive et une bande négative démontrant que les bases sont empilées au moyen d'interactions du type de VAN DER WAALS, sans appariement par liaisons hydrogène .

Ce calcul a été possible dans le cas des homopolynucléotides ayant une structure relativement simple. Il se complique dans le cas d'une structure complexe, comme celle du tRNA par exemple, renfermant plusieurs bases et plusieurs séquences.

Dans ce cas, CANTOR et TINGCO ont proposé une formule semi-empirique permettant de calculer le spectre de dispersion optique rotatoire d'un tRNA en simple et en double hélice.

CHAPITRE VI

RESULTATS DE LA CONFORMATION DES tRNA PAR DICHROISME CIRCULAIRE

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Matériel

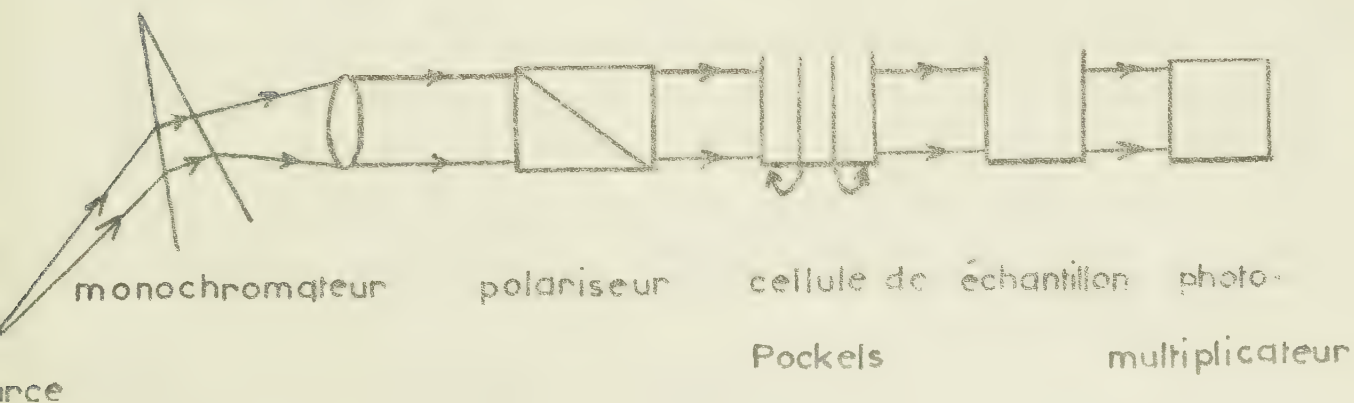
Nous avons utilisé du tRNA de levure de bière (BOEHRINGER) soit débarrassé de ses protéines par plusieurs lavages successifs au phénol, soit purifié par la méthode de fractionnement par contre-courant (chapitre II).

2) Mesures

a - Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées à l'aide d'un dichrographe JASCO.

Schéma de l'appareil :



Le faisceau de lumière monochromatique passe dans un polarisateur et tombe ensuite sur un cristal de phosphate monoammonique (cellule de POCKELS) taillé perpendiculairement à l'axe. Ce cristal devient biréfringent pour un faisceau se propageant le long de l'axe et lorsqu'il est soumis à un champ $\vec{E}$ alternatif parallèle à cet axe.

Après passage dans la solution échantillon optiquement active, le flux lumineux aboutit à un détecteur et développe une tension aux bornes d'un photomultiplicateur. Cette tension peut être décomposée en une composante continue V_c et une composante alternative V_{ac} . Le rapport V_{ac}/V_c est indépendant du coefficient de la cellule et il est relié à la différence d'absorption des vibrations gauche et droite par la relation suivante (VELLUZ et LEGRAND, 1961) :

$$\frac{V_{ac}}{V_c} = K (\epsilon_g - \epsilon_d) l \times c$$

où l est l'épaisseur de la cuve

c est la concentration de la solution.

Les mesures ont été effectuées dans des cuves de quartz thermostatées de 0,1 cm de chemin optique en général. Mais, l'étude de l'effet de la concentration en tRNA sur les courbes de dichroïsme circulaire a été réalisée en utilisant successivement des cuves de 0,005 cm, 0,01 cm, 0,1 cm et 1 cm. Mensuellement, l'appareil a été calibré avec une solution de isoandrosterone (VELLUZ et LEGRAND, 1961). On a pris soin de ne jamais dépasser la D. O. = 2, car l'énergie tombant sur le photomultiplicateur serait trop faible pour être détectée des artéfacts qui pourraient y avoir lieu. C'est pourquoi, nous avons également vérifié la tension aux bornes du photomultiplicateur lors de chaque expérience.

La température des cuves a été mesurée à l'aide d'un thermocouple placé en contact avec la cuve, étalonné en fonction de la température et

relié à un enregistreur (SEPHRAM). Les températures ont été maintenues avec un thermostat (HAAKE) qui propulse dans le support des cuves, de l'eau amenée à une température donnée.

Il est préférable d'utiliser des cuves pouvant se fermer. A partir de 50 à 60°, l'évaporation produite peut entraîner un changement dans les concentrations initiales.

Les spectres d'absorption UV du tRNA ont été déterminés avec un spectrophotomètre CARY 15 dans des cuves de quartz de 0,1 cm de chemin optique. La concentration du tRNA est telle que la molarité soit comprise entre 10^{-4} et 10^{-3} résidu nucléotidique (soit une D.O. comprise entre 1 et 2).

Le coefficient d'absorption molaire du tRNA est défini par la relation de CHARGAFF et ZAMENHOFF (1948) :

$$\epsilon(p) = \frac{D.O. \times l}{c}$$

D.O. est la densité optique de la solution,

l est l'épaisseur de la cuve en cm,

c est la concentration en atome-gramme de phosphore par litre (P/31).

Connaissant la concentration en phosphore et la densité optique de la solution de tRNA, on peut donc calculer la valeur de l' $\epsilon(p)$ correspondant. Nous avons trouvé une valeur moyenne de $\epsilon(p)$ pour le tRNA de levure de bière égale à 7250.

La valeur du dichroïsme circulaire est donnée par l'expression :

$$\epsilon_g - \epsilon_d = \frac{s \times d \times P.M.}{c \times l}$$

$$\epsilon_g - \epsilon_d = \frac{s \times d \times \epsilon(p)}{D.O.}$$

où s est la sensibilité de l'appareil,
 d représente le déplacement enregistré par l'appareil
après passage du flux lumineux dans la solution de tRNA,
 $P.M.$ est le poids moléculaire du tRNA,
 $D.O.$ est la densité optique du tRNA à 260 mμ,
 c est la concentration de la solution de tRNA (en g/litre)

b - Dosage du phosphore

Le dosage du phosphore a été effectué selon la méthode de AMES et DUBIN (1960) : c'est une microméthode permettant de doser 0,1 à 0,5 μg de P.

Méthode de AMES et DUBIN

Dans un tube à hémolyse en Pyrex, on met 0,10 ml de solution de tRNA (0,030 à 0,040 μg/ml). On ajoute exactement 0,025 ml de $Mg(NO_3)_2$ à 10 p.100 dans l'éthanol absolu. On chauffe en agitant le tube dans le cône bleu de la flamme d'un bec BUNZEN jusqu'à disparition des fumées rousses (environ 30 secondes). Lorsque les tubes sont refroidis, on ajoute 0,3 ml de HCl 0,5 N et on pose une bille de verre sur leur ouverture. On les porte au bain-marie bouillant pendant 15 minutes pour hydrolyser le pyrophosphate éventuellement formé. Tout le phosphore se trouve alors sous forme d'orthophosphate.

Aux tubes refroidis, on ajoute 0,7 ml d'un mélange préparé extemporanément de 1 volume de solution aqueuse d'acide ascorbique à 10 p.100 (solution que l'on peut conserver 1 mois à 4°) et de 6 volumes de molybdate d'ammonium, 4 H₂O à 0,42 p.100 dans H₂SO₄ N (solution stable à 20°). Les tubes sont bouchés avec une bille de verre et on les porte 1 heure au bain-marie à 37°. La lecture de la densité optique est faite contre de l'eau distillée à 820 mμ, à l'aide d'un spectrophotomètre ZEISS, dans des cuves de 1 cm de chemin optique. On effectue, en même temps, 3 essais pour

chaque échantillon, un blanc avec à la place du tRNA un volume identique de solvant (blanc que l'on soustrait des valeurs obtenues avec le tRNA) et une courbe d'étalonnage avec 0,005 , 0,01 et 0,02 μ moles de phosphore. La solution étalon est une solution aqueuse de K_2HPO_4 à 0,1 μ mole/ml.

c - Courbes de "fusion"

Les courbes de "fusion" du tRNA donnant la variation de la densité optique à 260 m μ en fonction de la température ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 14 dans des cuves de quartz de 1 cm de chemin optique.

Pour pouvoir comparer les courbes de "fusion" des différents échantillons, les diagrammes tracés représentent la fonction $D.O.t^\circ/D.O._{20^\circ} = f$ (températures).

d - Hydrolyse partielle du tRNA^{Ala}

Cette hydrolyse a été effectuée dans notre laboratoire par Mademoiselle G. SABEUR et Monsieur G. DIRHEIMER.

La fraction de tRNA obtenue par contre-courant et renfermant le tRNA^{Ala} est concentrée par dialyse contre une solution de CARBOWAX 600 à 25 p.100. Après précipitation alcoolique, le tRNA est dissous dans 2,1 ml de tampon Tris-HCl 0,02 M , $MgCl_2$ 0,02 M pH 7,5.

L'hydrolyse par la RNase T_1 se fait à 0° dans les conditions de HOLLEY et coll. (1965) :

2 mg de tRNA dissous dans 1 ml d'une solution 0,02 M de Tris-HCl pH 7,5 et renfermant du $MgCl_2$ à 0,02 M sont maintenus pendant 1 heure à 0° puis additionnés avec une pipette refroidie à 0°, de 0,15 ml d'une solution de RNase T_1 dans le tampon Tris-HCl , $MgCl_2$, à raison de 250 unités par ml.

On agite pendant 5 minutes avec une baguette de verre.

La RNase T_1 est ensuite éliminée par extraction phénolique. On ajoute 2 ml de phénol saturé avec le tampon ci-dessus au mélange de tRNA et de RNase T_1 . Après une agitation de 2 minutes et une centrifugation, on prélève la phase supérieure sur laquelle on effectue une deuxième puis une troisième extraction phénolique. Le surnageant est enfin traité par 2 ml d'éther anhydre pour éliminer le phénol. Cette extraction à l'éther est recommencée 5 fois. Les dernières traces d'éther sont éliminées en faisant barboter de l'air dans la solution.

Le volume est ajusté à 1,15 ml avec de l'eau distillée et l'on ajoute de l'urée de façon à obtenir une concentration finale de 7 M.

L'hydrolysate est dilué à 5 ml avec un tampon Tris-HCl 0,02 M, urée 7 M pH 8. Il est ensuite passé sur une colonne de DEAE-cellulose de 2 mètres de hauteur et de 3 mm de diamètre intérieur. L'élution par un gradient de NaCl se fait dans un appareil Varigrad dont les différents réservoirs renferment les solutions suivantes :

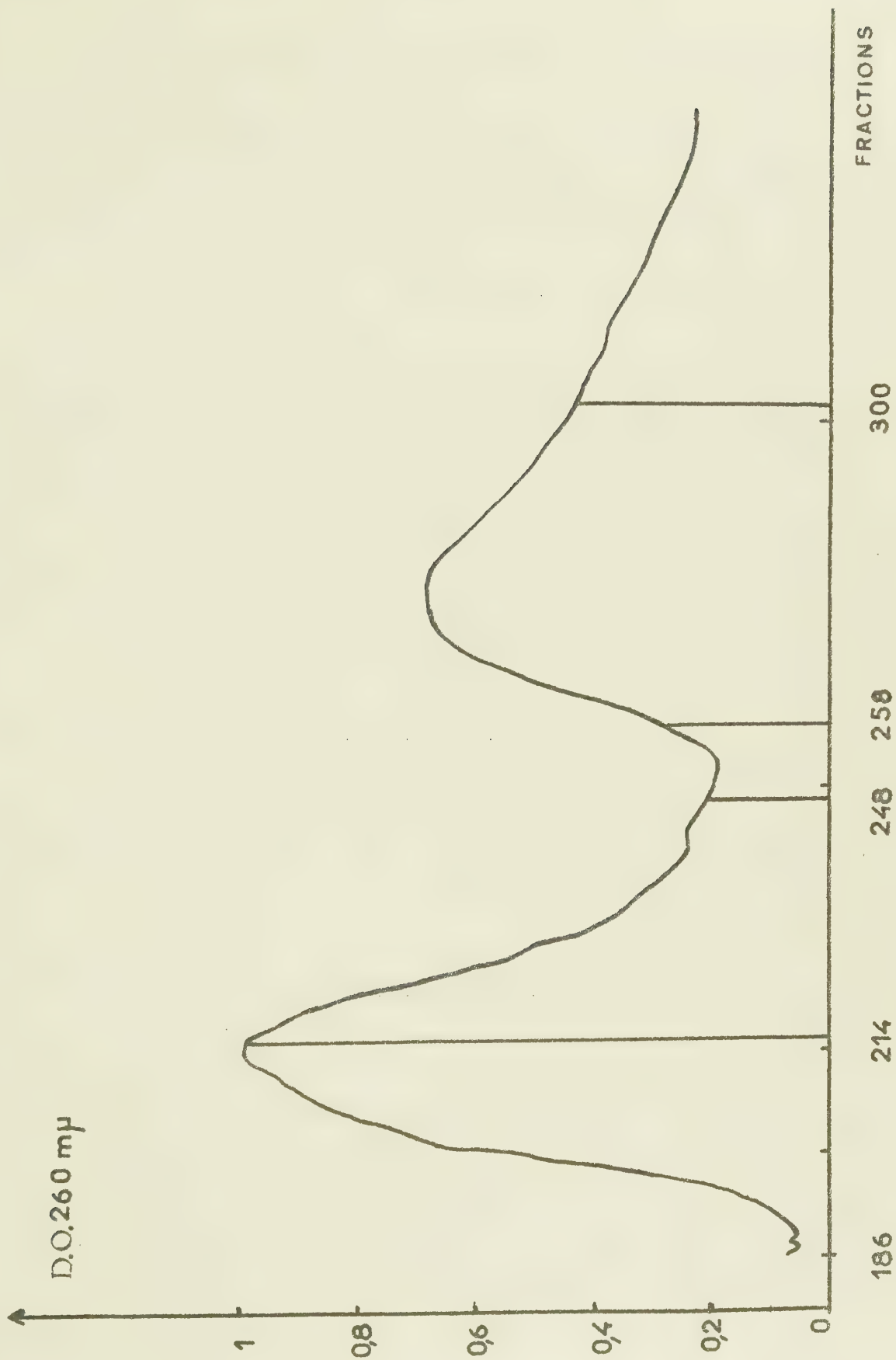
- premier réservoir : Tris-HCl 0,02 M , urée 7 M pH 8
- deuxième réservoir : NaCl 0,5 M dans le tampon Tris-HCl 0,02 M, urée 7 M pH 8
- troisième réservoir : NaCl 0,25 M dans le tampon Tris-HCl 0,02 M, urée 7 M pH 8
- quatrième réservoir : NaCl 0,5 M dans le tampon Tris-HCl 0,02 M, urée 7 M pH 8

Le profil de l'élution est indiqué dans la figure 7. La séparation obtenue n'est pas très bonne. Nous avons malgré tout recueilli séparément les fractions 186 à 214 et 215 à 248. Nous les avons concentrées de la façon suivante :

Après dilution par 3 volumes d'eau, les fractions ont été passées sur une petite colonne de DEAE-cellulose (4 cm de hauteur et 2 cm de diamètre).

Après lavage par 100 ml d'eau, l'élution a été effectuée par 10 ml de LiCl M. Les oligonucléotides ont été récupérés à partir de la solution ainsi concentrée par précipitation par 3 volumes d'alcool.

Figure 7 - CHROMATOGRAPHY, SUR DEAD-CELLULOSE D'UN tRNA^{Ala} APRES
HYDROLYSE MENAGEE PAR LA RNase T₁



II. DETERMINATION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DES tRNA

Le dichroïsme circulaire étant sensible à la conformation d'une macromolécule, nous avons essayé d'opérer dans des conditions où le tRNA était susceptible de posséder des structures secondaire et tertiaire différentes. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de l'environnement sur le spectre de dichroïsme circulaire des tRNA.

a - à faible force ionique : le tRNA est en solution soit dans du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, soit dans de l'EDTA 10^{-4} M pH 5,2.

Dans ces conditions, il existe un phénomène de répulsion exercé par les ions PO_4^{---} libres de la chaîne polynucléotidique. On peut supposer que les deux brins de la chaîne du tRNA qui seraient susceptibles de se rapprocher pour former une double hélice sont écartés par ces forces de répulsion. La structure en simple hélice serait alors favorisée.

b - à force ionique plus importante : le tRNA est en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M , KF 0,15 M pH 6,8.

Dans ces conditions, couramment employées, les forces de répulsion n'existent plus et l'on peut supposer que le tRNA possède alors une structure secondaire en double hélice.

c - en présence de magnésium : le tRNA est en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M , MgCl_2 0,01 M pH 6,8.

Nous avons opéré dans des conditions où les ions Mg^{++} sont prévalents. Nous savons que le magnésium stabilise la structure secondaire des acides nucléiques. Nous avons essayé d'obtenir un pH voisin de la neutralité, ce qui a été facile dans les conditions (b) et (c) mais beaucoup plus délicat à faible force ionique, lorsque le tRNA est en solution dans de l'EDTA 10^{-4} M non tamponné par du Tris 0,01 M.

Les expériences ont été réalisées avec du tRNA de levure de bière.

Nous constatons que l'allure générale du spectre reste la même quel que soit le solvant utilisé. Mais, l'amplitude des bandes augmente en fonction de la force ionique et de la concentration en magnésium (figure 8).

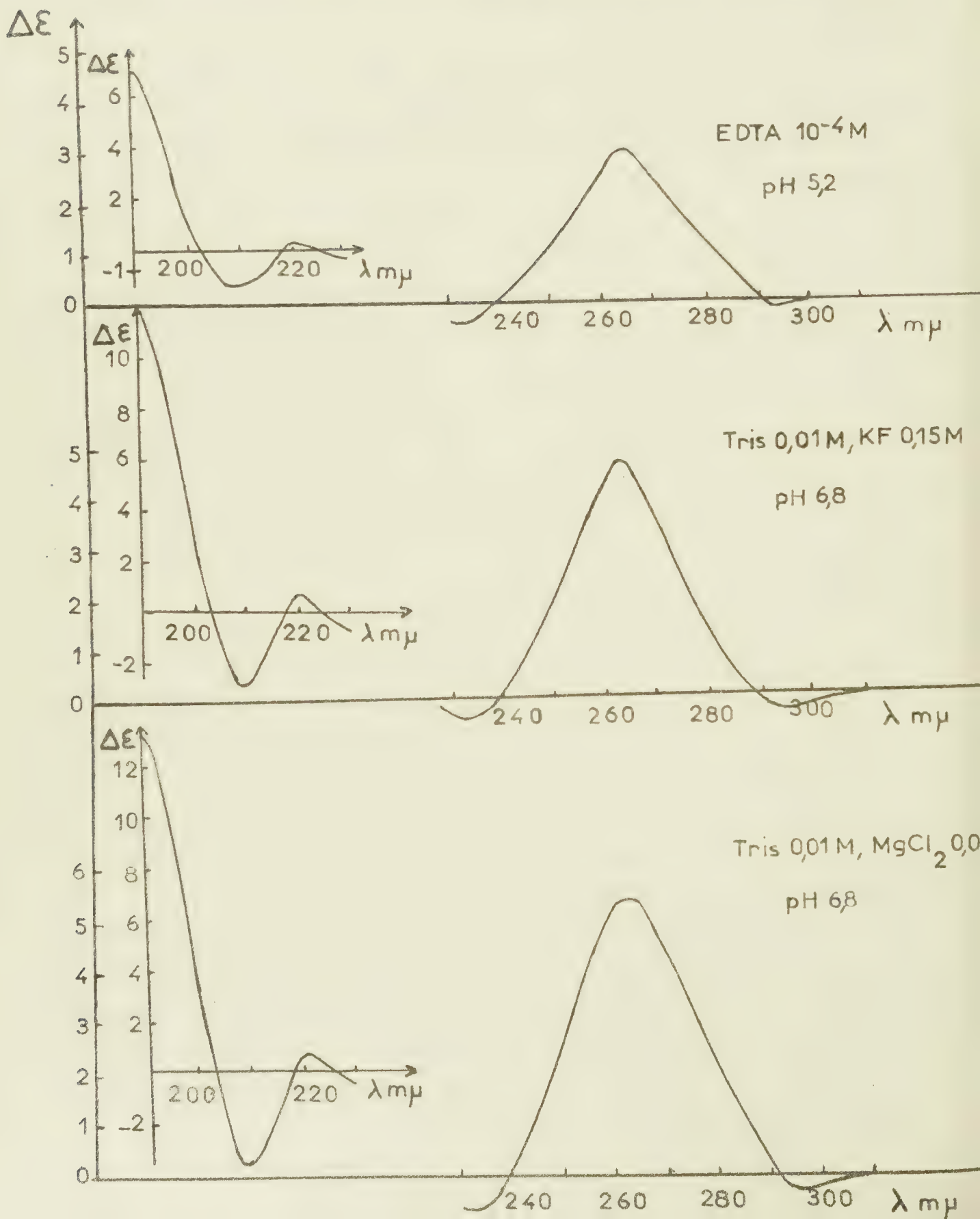
Dans la région spectrale de 190 m μ à 340 m μ , nous observons la présence de deux bandes positives principales : l'une centrée à 263 m μ , l'autre deux fois et demie plus intense centrée vers 190 m μ . Un troisième maximum de moindre amplitude est mis en évidence à 220 m μ ainsi que trois faibles bandes négatives à 295 m μ , 232 m μ et 210 m μ .

Il a été démontré que les bandes d'absorption positives dont le maximum se situe à 263 m μ et à 190 m μ sont des bandes correspondant à des transitions électroniques perpendiculaires à l'axe de l'hélice ($\pi \rightarrow \pi^*$). Par contre, on suppose que la bande négative dont l'extrémum se situe à 295 m μ est une bande d'absorption correspondant à des transitions électroniques parallèles à l'axe ($n \rightarrow \pi^*$).

Signalons que les mesures du spectre étudié dans la région spectrale inférieure à 220 m μ sont moins précises que celles effectuées à des longueurs d'onde supérieures car cette région est plus difficilement accessible. Dans cette région, nous avons opéré à la limite du pouvoir de résolution de l'appareil. Le bruit de fond devient important. C'est pourquoi, nous avons essayé d'éviter au maximum les phénomènes de diffusion de la lumière. Nous avons été, en outre, obligé de diluer les solutions de tRNA pour en diminuer l'absorption qui devenait trop forte à ces longueurs d'onde.

L'allure de ce spectre ressemble à celle des oligocytidylates observée par BUSH et BRAHMS (1967) et BRAHMS et coll. (1967). Contrairement à ce que laisse présager la théorie excitonique, nous n'observons pas la présence de deux bandes dichroïques identiques mais de signe opposé comme c'est le cas pour le DNA ou le poly A. Ce problème est repris de façon plus détaillé dans la discussion.

Figure 8 - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LE SPECTRE DE
DICHROISME CIRCULAIRE DE tRNA DE LEVURE DE BIÈRE



Avant de poursuivre notre étude sur la structure des tRNA, il fallait nous assurer que les résultats précédents n'étaient pas faussés par l'existence de liaisons intermoléculaires ou par la formation d'aggrégats. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de la concentration en tRNA sur le spectre de dichroïsme circulaire des tRNA.

III. EFFET DE LA CONCENTRATION EN tRNA SUR LE SPECTRE DE D. C.

La formation d'aggrégats est favorisée à basse température, à force ionique importante et en présence de magnésium.

Nous avons effectué les mesures de D. C. , à deux températures différentes, sur des solutions de tRNA faiblement ionisées dont nous avons fait varier la concentration.

La figure 9 montre les résultats obtenus à 3° et à 25° pour des solutions de tRNA dans du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,2 dont les concentrations variaient de $2 \cdot 10^{-4}$ à $6 \cdot 10^{-2}$ résidus nucléotidiques.

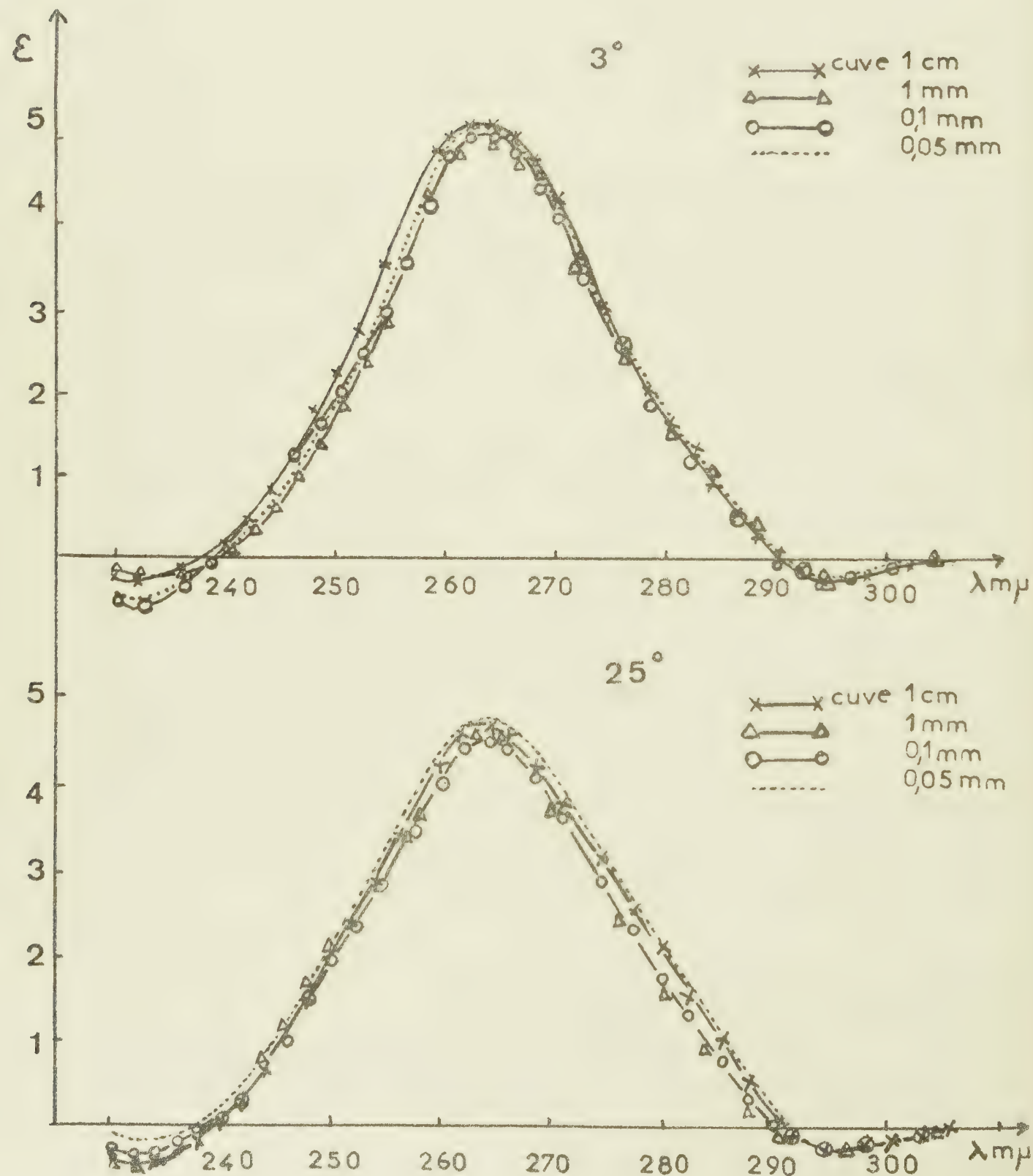
Dans la région spectrale de 230 mμ à 340 mμ, nous ne constatons pas de variation d'intensité du dichroïsme circulaire en fonction de la concentration. Le phénomène observé dans cette région est donc bien dû à des interactions intramoléculaires et non intermoléculaires.

FRESCO et coll. (1966) et MILLAR et coll. (1966) ont obtenu des résultats similaires par des méthodes hydrodynamiques dans les conditions de faible concentration ionique où nous nous sommes placés. Par contre, à forte concentration ionique et à concentration importante en magnésium, ces auteurs ont obtenu des phénomènes d'aggrégation.

IV. DENATURATION THERMIQUE DU tRNA

Le dichroïsme circulaire se manifestant pour une molécule présentant une dissymétrie, il est possible par cette méthode de suivre la

Figure 9 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN tRNA SUR LE
SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE



destruction d'une structure ordonnée en fonction de la température.

Nous avons étudié l'effet de la température sur le D. C. de tRNA totaux dans deux conditions de force ionique différentes :

- en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,2 ,
- en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M , KF 0,15 M pH 7,2.

L'examen des courbes de "fusion" du tRNA en fonction de la température (figure 10) montre que celles-ci peuvent se diviser en deux parties : l'une allant de 0° à 20°, l'autre au-delà de 20°.

a - de 0° à 20° : la courbe de "fusion" du tRNA n'a pas l'allure d'une sigmoïde régulière, mais se présente sous la forme d'une courbe complexe renfermant des irrégularités. Dans ce domaine de température, nous observons une augmentation du maximum d'intensité du spectre dichroïque. Lorsque le tRNA est en solution faiblement ionique, cet accroissement d'amplitude se traduit par la présence d'une seule irrégularité. A force ionique plus importante, il semble se produire un début de résolution d'une deuxième irrégularité.

Pour nous assurer que ce phénomène n'était pas dû à une impureté présente dans la préparation commerciale, nous avons, dans une première série d'expériences, déprotéinisé le tRNA en lui faisant subir plusieurs traitements phénoliques successifs. Nous avons ensuite étudié la courbe de "fusion" d'un tRNA^{Phe} purifié par fractionnement par contre-courant (chapitre II). Nous avons constaté qu'aussi bien le tRNA déprotéinisé que le tRNA^{Phe} renfermaient encore des matières colorées présentes dans la préparation commerciale. C'est pourquoi, le tRNA^{Phe} a été en outre passé sur une colonne d'hydroxyapatite (chapitre II). Les figures 11 et 12 montrent que les courbes de "fusion" de tRNA ayant subi de tels traitements présentent encore des irrégularités entre 0° et 20°. Nous pouvons remarquer également que dans le cas du tRNA^{Phe}, le phénomène est plus intense que dans le cas du tRNA total.

Figure 10 - DENATURATION THERMIQUE DE tRNA DE LEVURE DE BIÈRE

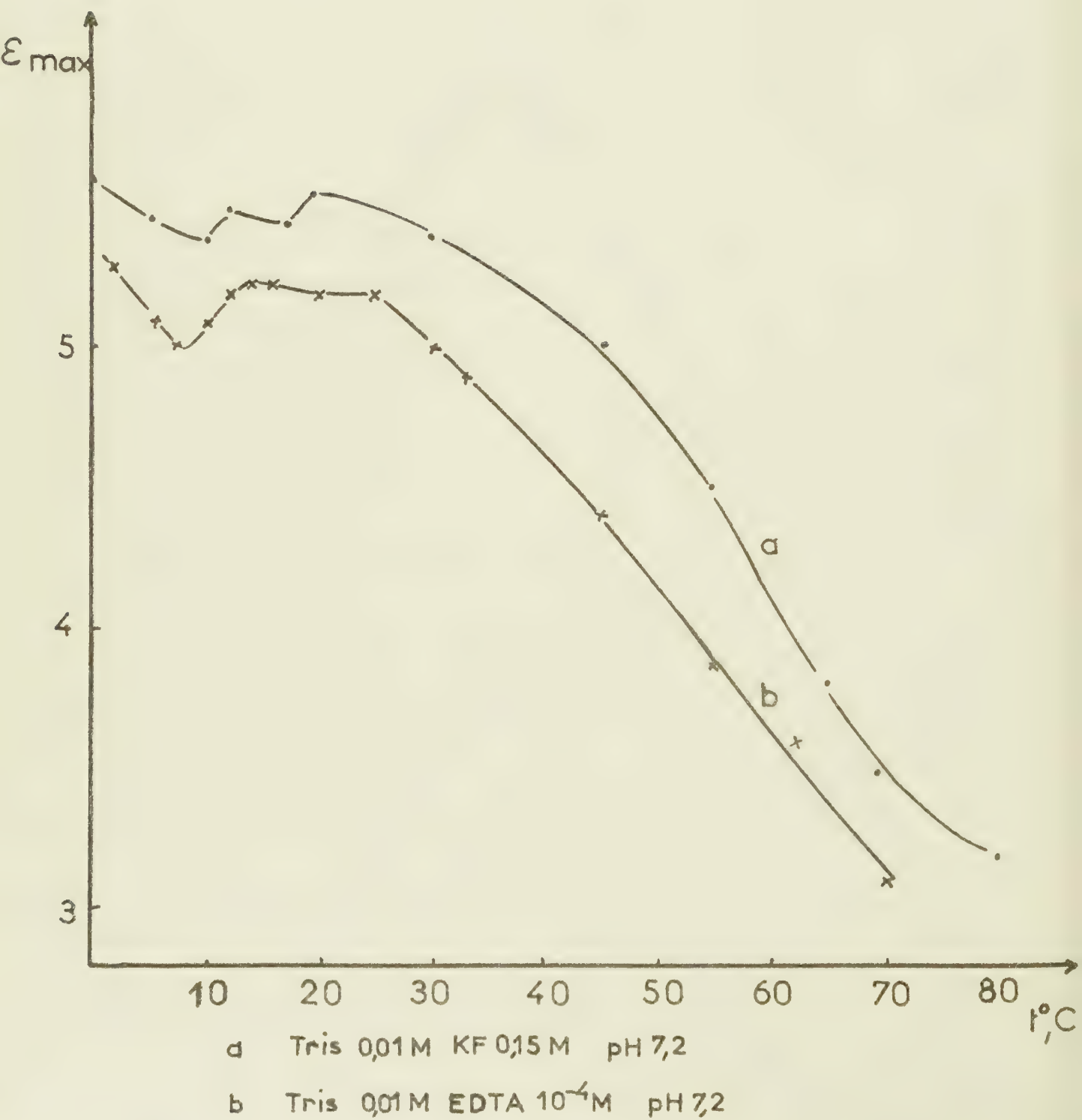


Figure 11 - DENATURATION THERMIQUE D'UN tRNA DE LEVURE DE BIERE
AYANT SUBI PLUSIEURS TRAITEMENTS PHENOLIQUES SUCCESSIFS

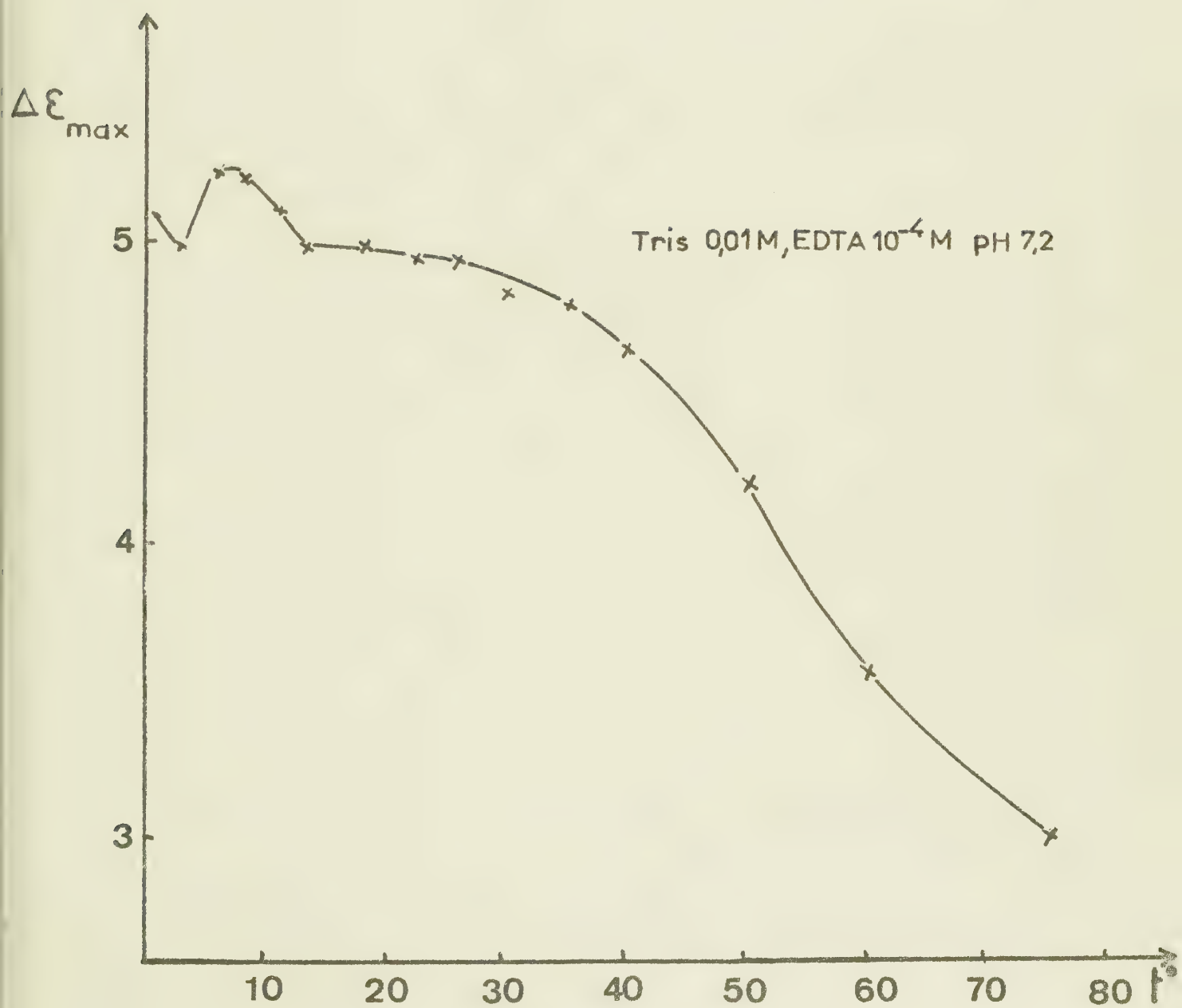
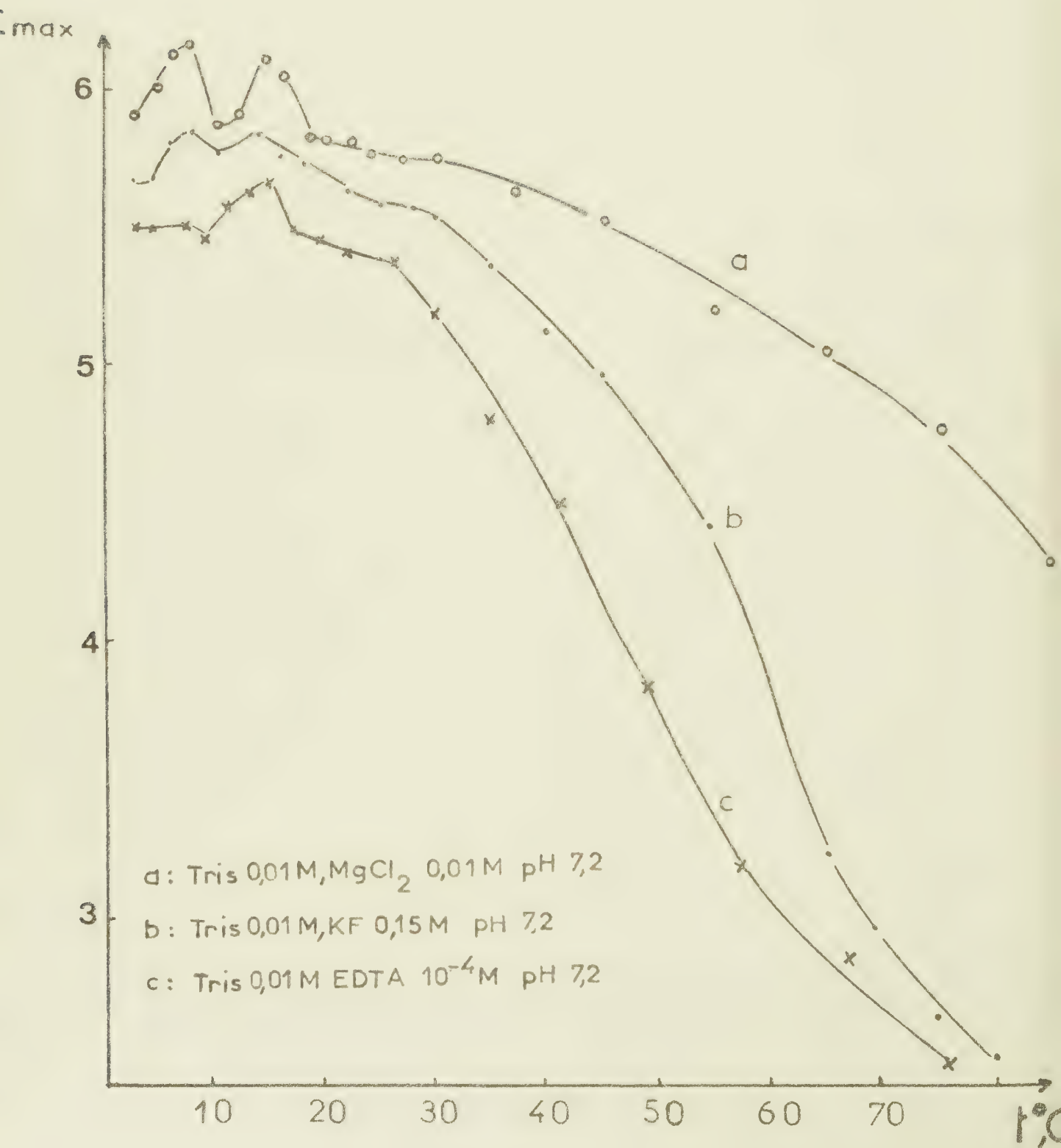


Figure 12 - DENATURATION THERMIQUE DU tRNA^{Phe} EN FONCTION
DE LA FORCE IONIQUE



Ce changement d'amplitude à basse température semble être un phénomène assez caractéristique du tRNA puisqu'il a été observé sur d'autres tRNA de levure de bière que le tRNA^{Phe}, en particulier sur le tRNA^{Ala} ou le tRNA^{Val} (partiellement purifiés par distribution en contre-courant) et aussi sur un tRNA d'une autre espèce : un tRNA d'embryon de poulet préparé dans notre laboratoire par Madame G. BECK.

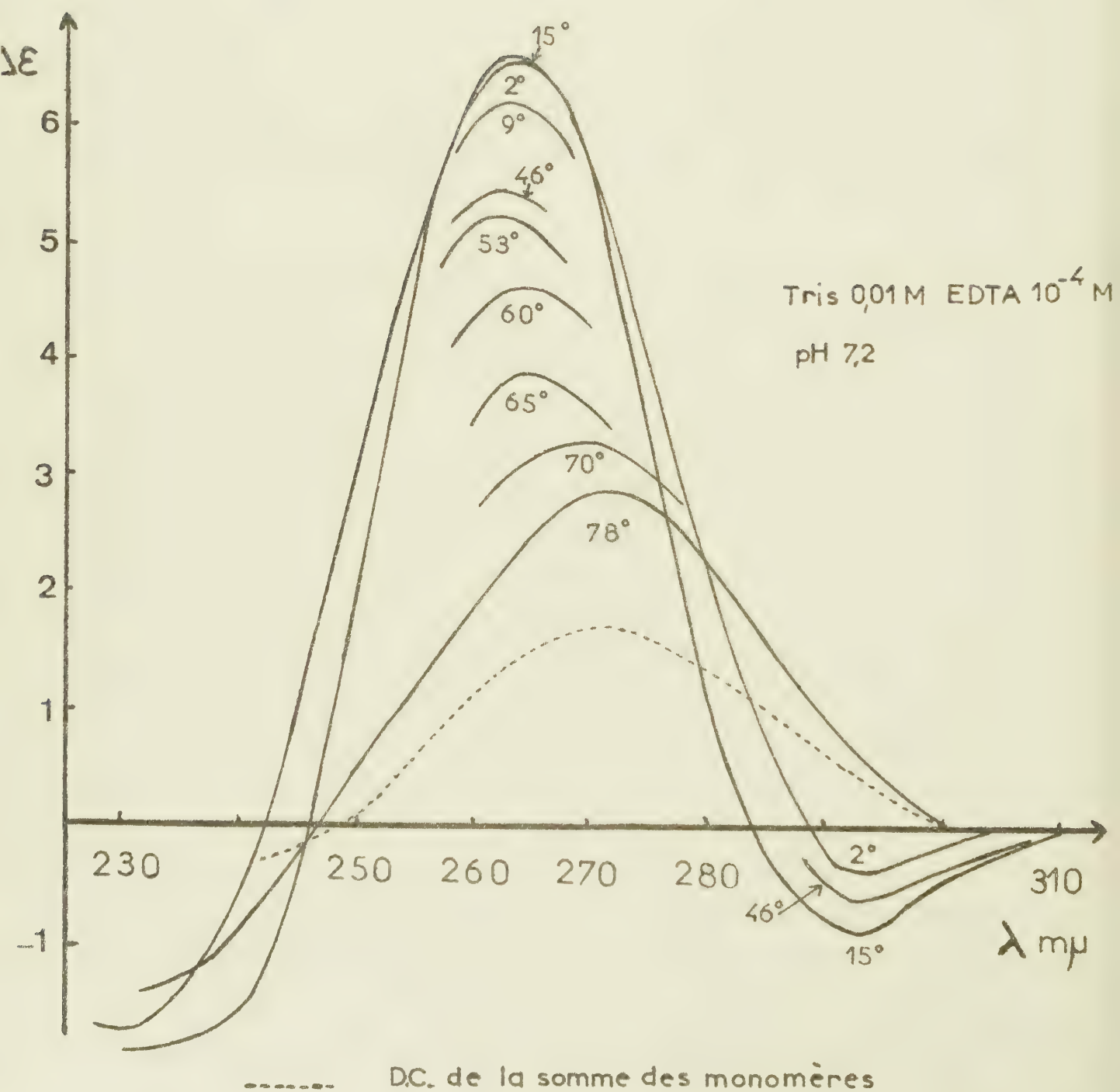
Pour éliminer le plus possible les causes d'erreurs qui pourraient être dues à la présence d'impuretés, nous avons par la suite utilisé du tRNA^{Phe} purifié par distribution en contre-courant et passé sur colonne d'hydroxyapatite.

b - au-delà de 20° : que ce soit avec du tRNA total ou du tRNA purifié, les résultats obtenus sont identiques. L'augmentation de température provoque une diminution progressive de l'intensité de la bande dichroïque présentant un maximum à 263 mμ (figure 13). Cette décroissance est accompagnée d'un faible déplacement du maximum vers les longueurs d'onde plus élevées qui s'accroît à haute température. A 80°, le maximum d'intensité est à 270 mμ. Nous constatons également une diminution progressive de la bande négative dont le minimum se situe à 295 mμ. A 50°, cette bande a disparu. A haute température, le spectre de D. C. ressemble à celui de l'ensemble des monomères obtenu par hydrolyse totale alcaline du tRNA. DOTY et coll. (1959) ont montré par hyperchromicité que l'existence d'une telle courbe de "fusion" pour des oligonucléotides, lorsque la température croît, est caractéristique d'une transformation conformationnelle : structure hélicoïdale $\rightleftharpoons$ structure désordonnée.

L'ensemble de nos résultats démontre donc l'existence d'une structure secondaire hélicoïdale pour le tRNA.

Nous constatons également que la force ionique a une influence sur la "fusion" du tRNA. La pente de la courbe de "fusion" du tRNA à faible force ionique est inférieure à celle de la courbe de "fusion" du tRNA en

Figure 13 - EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LE SPECTRE DE DICHROISME
CIRCULAIRE DU tRNA^{Phe}



solution dans du KF 0,15 M. En se basant sur les résultats obtenus par BRAHMS et coll. (1966) pour les oligomères, on pouvait se demander si le tRNA à faible force ionique était en simple hélice. A titre d'essai, nous avons soumis nos résultats à l'analyse par la méthode de VANT'HOFF (VAN HOLDE et coll., 1965) tout en ayant conscience de la complexité des phénomènes de "fusion" dans le cas des structures mixtes. Pour cela, nous avons supposé qu'à basse température la conformation ordonnée est favorisée et qu'à haute température la pelote statistique prédomine. En faisant cette supposition, à une température intermédiaire, nous pouvons définir une constante d'équilibre K :

$$K = \frac{\epsilon_0 + \epsilon_T}{\epsilon_T - \epsilon_N}$$

où ϵ_0 est la valeur du D. C. lorsque le tRNA possède une structure hélicoïdale,

ϵ_N est la valeur du D. C. à haute température (similaire à celle obtenue pour l'ensemble des monomères),

ϵ_T est la valeur du D. C. à une température donnée.

Il est alors possible de tracer la courbe $\log K = f(1/T)$. L'extrapolation de la droite obtenue, nous permet de calculer la variation d'enthalpie ΔH par la formule de VANT'HOFF :

$$\log K = - \frac{\Delta H}{R T} + \text{Cste}$$

Dans ces conditions, il est évident que la signification de la valeur de ΔH ainsi déterminée est complexe car la signification de la constante d'équilibre K est elle-même inconnue. D'autre part, étant donné que nous avons effectué nos expériences en solution très diluée, il est possible d'appliquer ce procédé pour une "fusion" de type coopératif (APPLEQUIST

(1965). Ainsi, pour une transition coopérative, la pente de la courbe de transition est indépendante des paramètres de coopérativité et peut permettre de calculer directement ΔH .

La figure 14 montre les résultats obtenus pour un tRNA total en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,2.

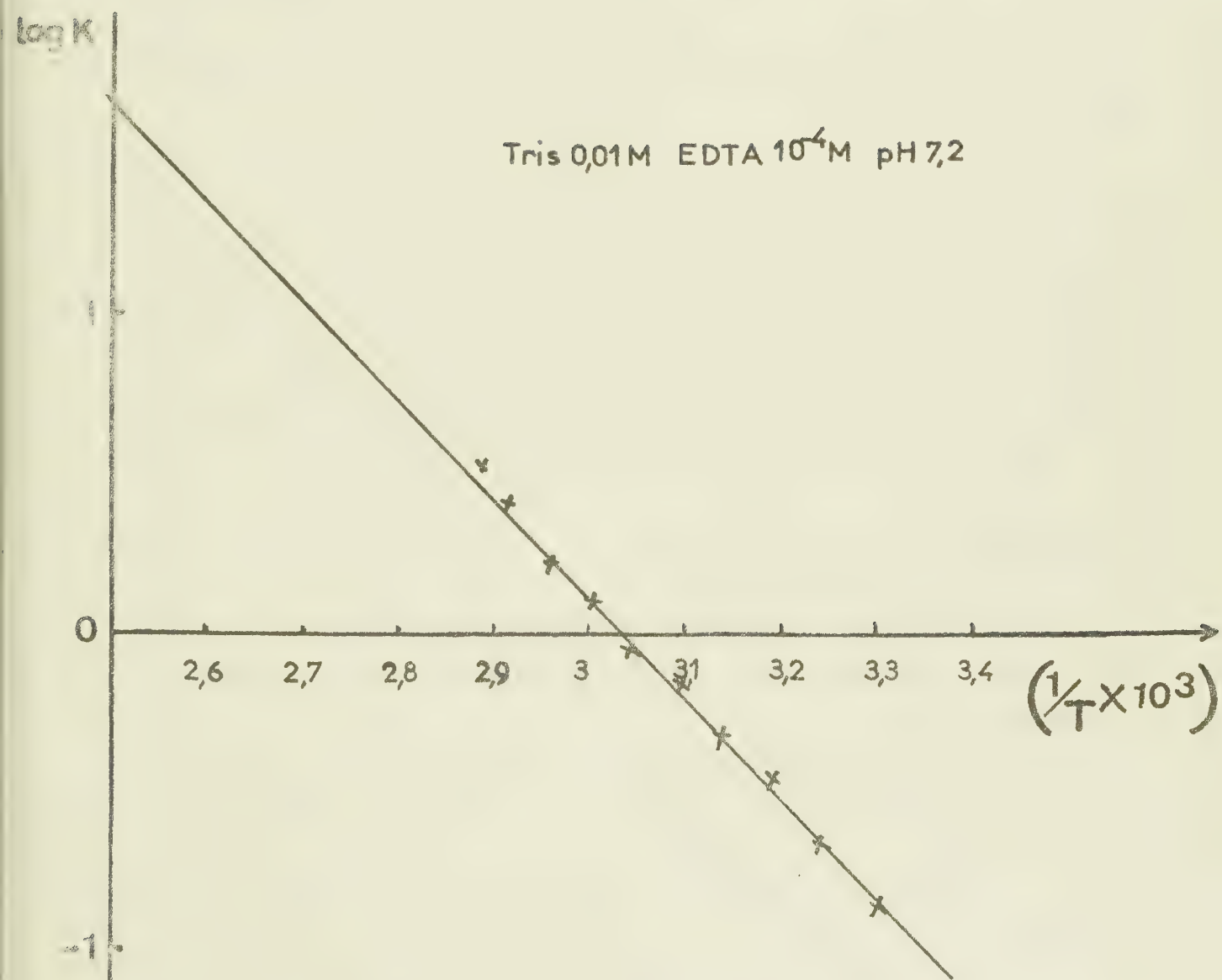
La valeur trouvée pour ΔH est égale à 13 800 calories. Elle est supérieure à celle trouvée pour les oligomères en simple hélice qui varie de 6 000 à 8 000 calories (POLAND et coll., 1966 ; BRAHMS et coll., 1967 ; DAVIS et TINOCO, 1967). Nous ne pouvons donc pas affirmer que le tRNA en solution aqueuse faiblement ionisée est entièrement en simple hélice. La pente de sa courbe de "fusion" étant plus faible que celle d'un tRNA en solution dans du KF 0,15 M la structure en simple hélice semble favorisée.

V. EFFET DU MAGNESIUM SUR LE SPECTRE DE D.C.

De nombreux auteurs ont observé l'effet stabilisateur du magnésium sur la structure des acides nucléiques : BOEDKER (1960) ; GIACONOMI et SPIEGELMAN (1962), NISHIMURA et NOVELLI (1963) ; PENNISTON et DOTY (1963) ; MILLAR et Mc KENZIE (1967), etc.

C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence du magnésium sur le spectre de D.C. d'un tRNA et en particulier d'un tRNA^{Phe} purifié. Nous avons vu que FRESCO et coll. (1966) et MILLAR et coll. (1966) ont observé la formation d'aggrégats au-delà de certaines concentrations en magnésium. Les conditions expérimentales sont donc très importantes et nous nous sommes placés dans des conditions telles que les interactions intermoléculaires ne soient pas possible. Le tRNA^{Phe} est en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M, $MgCl_2$ 0,02 M pH 7,2. Nous avons vu précédemment que le magnésium provoque une augmentation de l'intensité du phénomène de D.C. Ceci peut être considéré comme une première preuve de la stabilisation de la structure du tRNA par le magnésium. L'effet de la température

Figure 14 - DETERMINATION DE LA VARIATION D'ENTHALPIE DU tRNA DE
LEVURE DE BIERE PAR LA METHODE DE VANT'HOFF



sur le spectre de D. C. du tRNA^{Phe} constitue une deuxième preuve de cette stabilisation. La courbe de "fusion" du tRNA^{Phe} en présence de magnésium peut aussi se diviser en deux parties (figure 12) :

De 0° à 20°, l'accroissement de température provoque une augmentation du maximum d'intensité du D. C. qui se traduit par l'apparition de deux irrégularités sur la courbe de "fusion". Le phénomène est plus intense que dans les deux cas précédents (faible force ionique et en présence de KF).

Au-delà de 20°, on observe une diminution progressive de l'intensité du D. C., mais elle s'effectue lentement. A 85°, la fusion du tRNA^{Phe} n'est pas encore totale.

Cette stabilité accrue du tRNA en présence d'ions Mg^{++} est difficile à interpréter et traduit probablement un phénomène complexe. On peut penser que la structure hélicoïdale est stabilisée par la formation de liaisons ioniques entre le magnésium et les ions phosphates de la chaîne polynucléotidique (KOTIN et LYONS, 1965) supprimant ainsi l'effet des forces électrostatiques de répulsion qui ont tendance à affaiblir les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires en l'absence de magnésium.

VI. ETUDE DE LA REVERSIBILITE

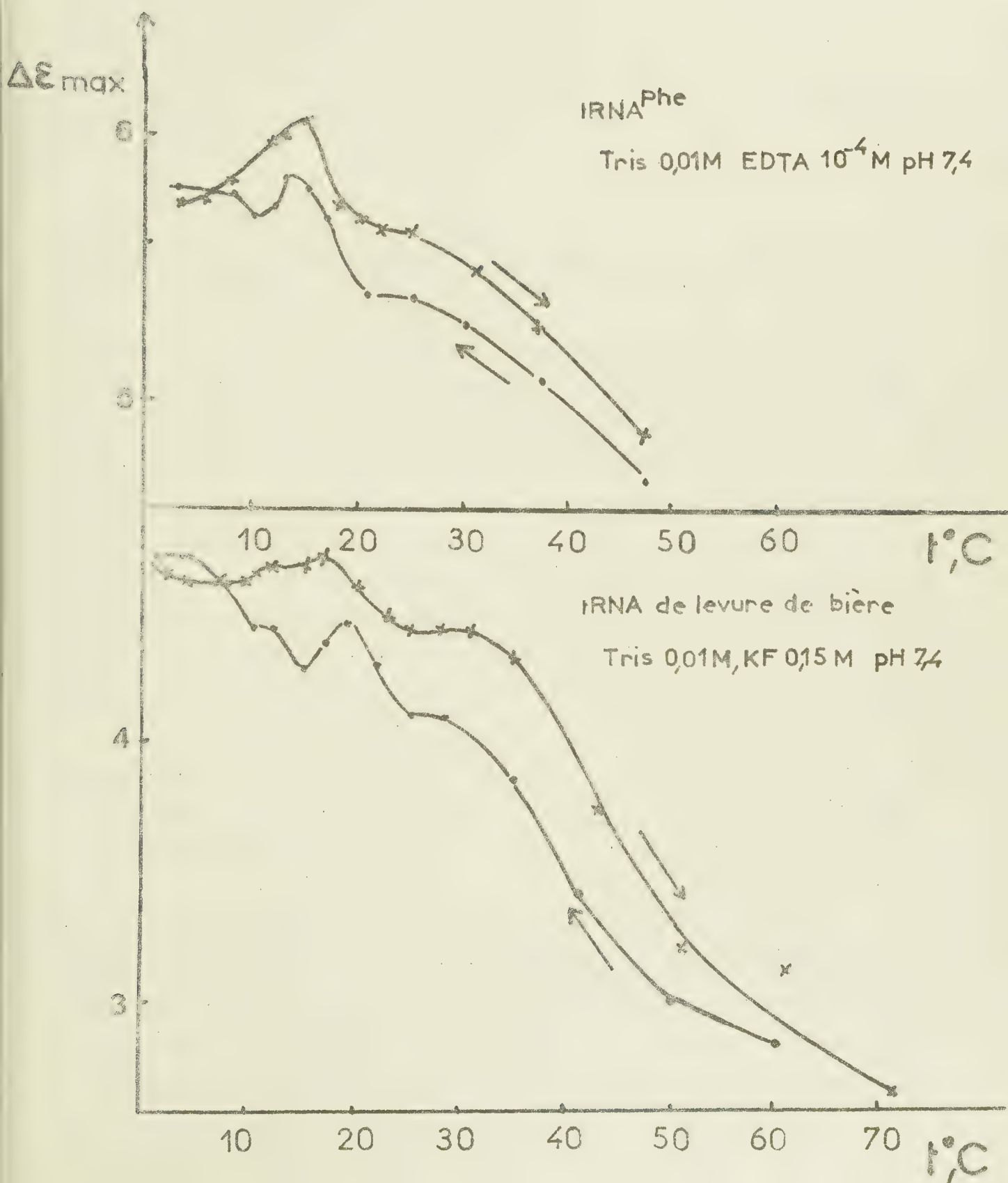
L'étude de la réversibilité pouvait nous apporter des résultats importants pour expliquer la présence des irrégularités dans la courbe de "fusion" du tRNA.

Nous avons montré que l'augmentation du maximum d'intensité de 0° à 20° était un phénomène réversible que ce soit pour un tRNA total ou un tRNA^{Phe} purifié.

La figure 15 montre les résultats obtenus dans différentes conditions de forces ioniques.

L'accroissement d'amplitude observé dans ce domaine de température n'est donc pas dû à une destruction de la structure primaire du tRNA.

Figure 15 - ETUDE DE LA REVERSIBILITE DES tRNA



C'est un phénomène indépendant de cette structure. On peut donc se poser la question de savoir si la structure secondaire ou bien tertiaire n'intervient pas. Dans ce but, nous nous sommes proposés d'étudier la variation de la densité optique en fonction de la température ainsi que la courbe de "fusion" d'un tRNA^{Ala} partiellement hydrolysé dont on peut supposer que la structure tertiaire n'existe pas.

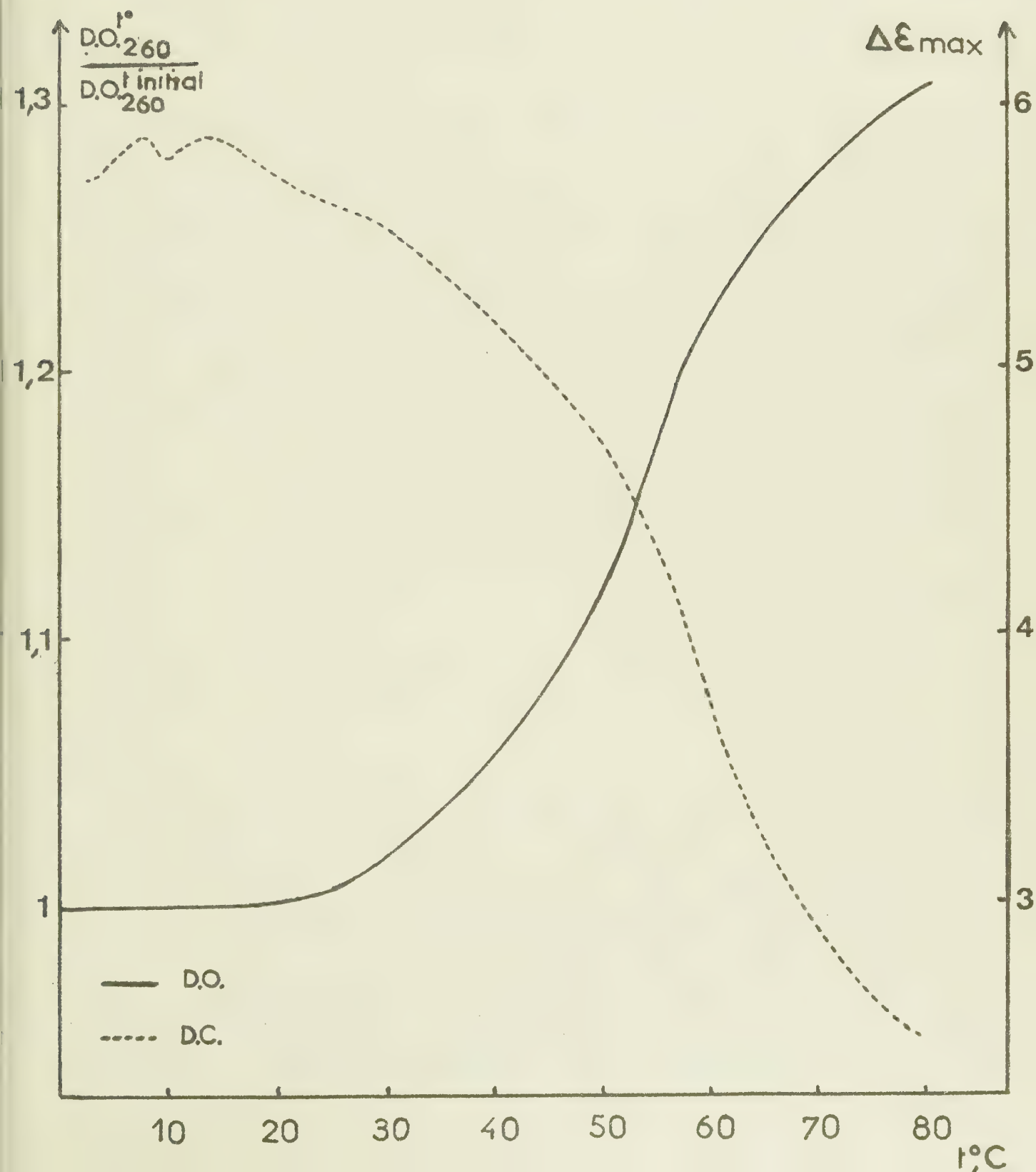
VII. VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Cette méthode est souvent utilisée dans l'étude de la structure secondaire des acides nucléiques. Sa théorie basée sur l'hypochromicité des acides nucléiques à basse température rend compte des interactions du type de VAN DER WAALS qui existent entre bases puriques et pyrimidiques. La variation de la densité optique en fonction de la température est un phénomène moins spécifique que la dispersion optique rotatoire ou le dichroïsme circulaire, mais comme elle est sensible à la structure secondaire, il était intéressant de voir si les irrégularités étaient détectables par cette méthode.

Nous avons étudié la variation de la D. O. en fonction de la température d'un tRNA total et d'un tRNA^{Phe} purifié, en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M, KF 0,15 M pH 7,2. La courbe de "fusion" présente un palier de 0° à 25° (figure 16). Au-delà de cette température, le D. O. augmente progressivement en fonction de la température. A 80°, la fusion du tRNA est terminée. La D. O. ne varie plus. Aucune variation anormale de D. O. n'a donc été observée de 0° à 25° par cette technique.

Dans le but d'améliorer la sensibilité de nos mesures et de détecter la plus faible variation possible de D. O., nous avons employé une méthode différentielle. La variation de D. O. a été mesurée en prenant comme témoin non plus la solution tampon, mais le même tRNA dont la température reste constante (température ambiante) au cours de l'expérience. Ceci nous

Figure 16 - ETUDE DE LA VARIATION DE LA D.O. DU tRNA^{Phe} EN SOLUTION
DANS KF 0,15 M , Tris 0,01 M pH 7,2



a permis d'utiliser une échelle de D.O. très sensible. La totalité de l'échelle représente 0,1 de D.O.. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé non plus de variation de D.O. de 0° à 25°. Les irrégularités observées par D.C. ne semblent donc pas être reliées à la structure secondaire du tRNA.

VIII. ETUDE D'UN tRNA^{Ala} SOUMIS A UNE HYDROLYSE MENAGEE

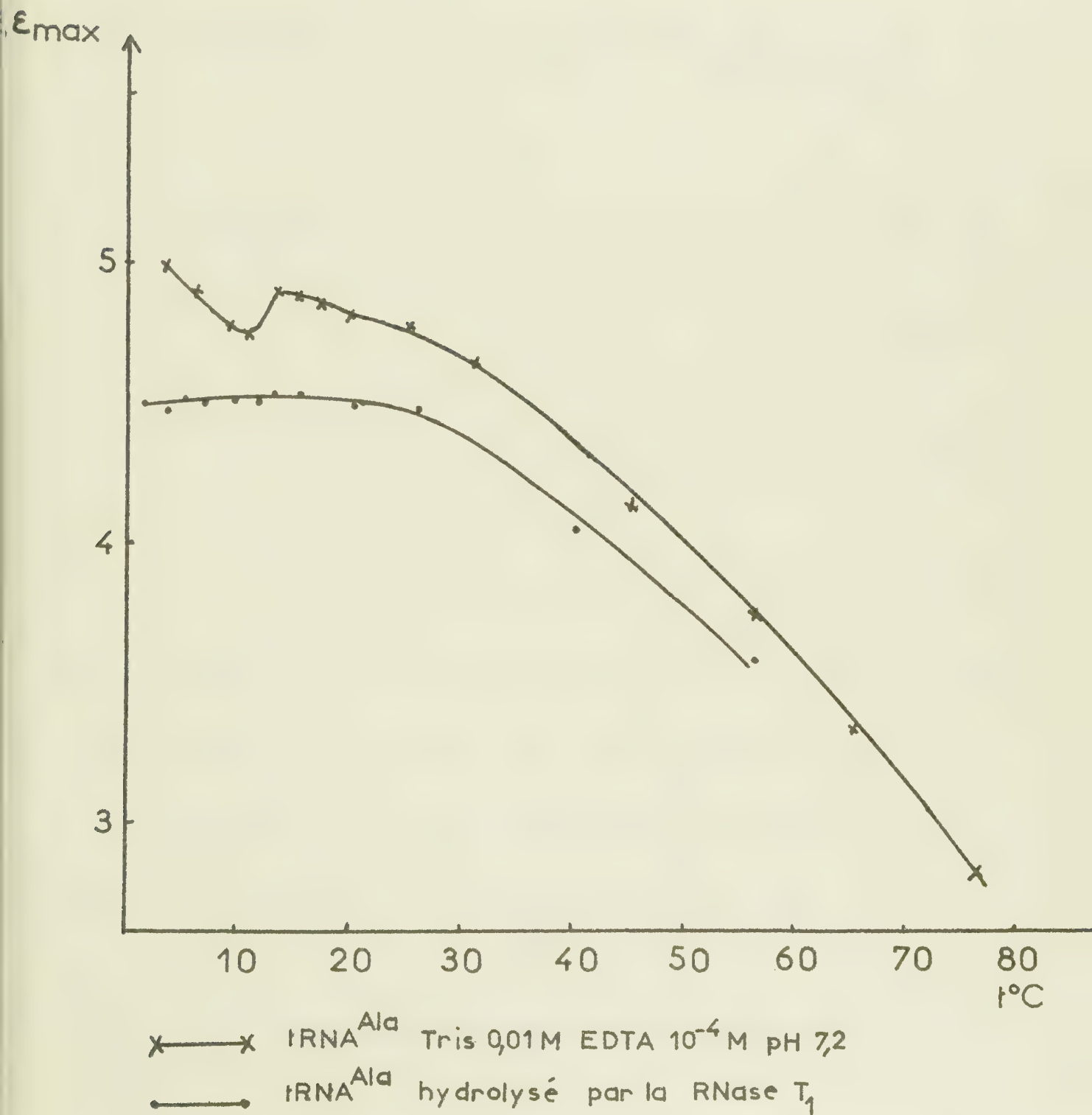
Nous pensons que les irrégularités de la courbe de "fusion" observées par D.C. pourraient être reliées à la structure tertiaire du tRNA. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience suivante : nous avons hydrolysé partiellement par la RNase T₁ pendant 5 minutes selon la méthode de HOLLEY et coll. (1965) du tRNA^{Ala} purifié par distribution en contre-courant dans notre laboratoire par Monsieur DIRHEIMER. Le tRNA hydrolysé ne fixe plus d'acides aminés et possède une constante de sédimentation de 2,08 S alors que celle du tRNA initial était de 3,9 S. Il semble donc que nous ayons par cette méthode hydrolysé le tRNA en deux moitiés.

Les mesures de D.C. nous permettent de constater (figure 17) :

- a) que l'intensité du phénomène est plus forte pour le tRNA intact que pour le tRNA hydrolysé,
- b) que la courbe de "fusion" du tRNA hydrolysé est sigmoïdale et ne présente pas d'irrégularités de 0° à 20°, contrairement à celle du tRNA initial.

Etant donné que la courbe de "fusion" démontre l'existence d'une structure secondaire pour le tRNA hydrolysé, cette expérience est une nouvelle preuve que les irrégularités sont indépendantes de la structure secondaire du tRNA. En effet, dans le cas du tRNA intact, nous avons montré par hyperchromicité, que l'augmentation du maximum d'intensité du spectre de D.C. à basse température ne semble pas dépendre de sa structure secondaire et que c'était un phénomène réversible, donc indépendant de sa structure primaire. Ces dernières expériences seraient donc en faveur de l'hypothèse

Figure 17 - ETUDE COMPAREE DE LA DENATURATION THERMIQUE DU tRNA^{Ala} INTACT ET DU tRNA^{Ala} HYDROLYSE PARTIELLEMENT PAR LA RNase T₁



selon laquelle ce serait la structure tertiaire du tRNA qui serait modifiée au cours de sa "fusion" de 0° à 20°.

IX. DETERMINATION THEORIQUE DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DU tRNA^{Phe}

Connaissant la structure totale du tRNA^{Phe}, nous avons essayé de voir s'il était possible de déterminer par calcul le spectre de D.C. de ce tRNA par la méthode de CANTOR et coll. (1966). Dans cette théorie, les interactions dans une chaîne polynucléotidique sont réduites à celles qui existent entre nucléotides voisins (théorie du plus proche voisin ; CANTOR et TINOCO, 1965).

a)- A partir de cette hypothèse, pour un tRNA en simple hélice, ces auteurs ont établi la relation suivante :

$$\Delta(\epsilon)_{\text{tRNA}} = 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 X_{ij} \Delta(\epsilon_{ij}) - \sum_{i=1}^4 \Delta(\epsilon_i)$$

où X_{ij} représente la fraction molaire d'un dinucléotide dans la chaîne du tRNA,

$\Delta(\epsilon_{ij})$ représente le D.C. d'un dinucléotide de la chaîne du tRNA,

$\Delta(\epsilon_i)$ représente le D.C. d'un monomère de la chaîne du tRNA,

X_i représente la fraction molaire d'un monomère dans la chaîne du tRNA.

b) Lorsque le tRNA est en double hélice, CANTOR et TINOCO ont proposé la relation suivante :

$$\Delta(\epsilon)_{\text{tRNA}}^D = 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 x_{ij} \Delta(\epsilon_{ij})^D - \sum_{i=1}^4 \Delta(\epsilon_i)^D$$

$\Delta(\epsilon_{ij})^D$ représente le D. C. d'un dinucléotide en double hélice de la chaîne du tRNA,
 $\Delta(\epsilon_i)^D$ représente le D. C. d'un monomère de la chaîne du tRNA.

Il est donc possible de déterminer le D. C. d'un tRNA connaissant le D. C. des dinucléotides qui le composent et la contribution des paires G-C et A-U.

Nous avons pu réaliser ce calcul grâce à J. C. MAURIZOT qui nous a fourni les spectres de la plupart des dinucléotides phosphates à pH 7,5 dans KF 4,7 M. Pour effectuer le calcul de la courbe du tRNA en double hélice, nous avons déterminé expérimentalement le spectre de D. C. d'un poly (G+C) et d'un poly (A+U), tous deux en double hélice.

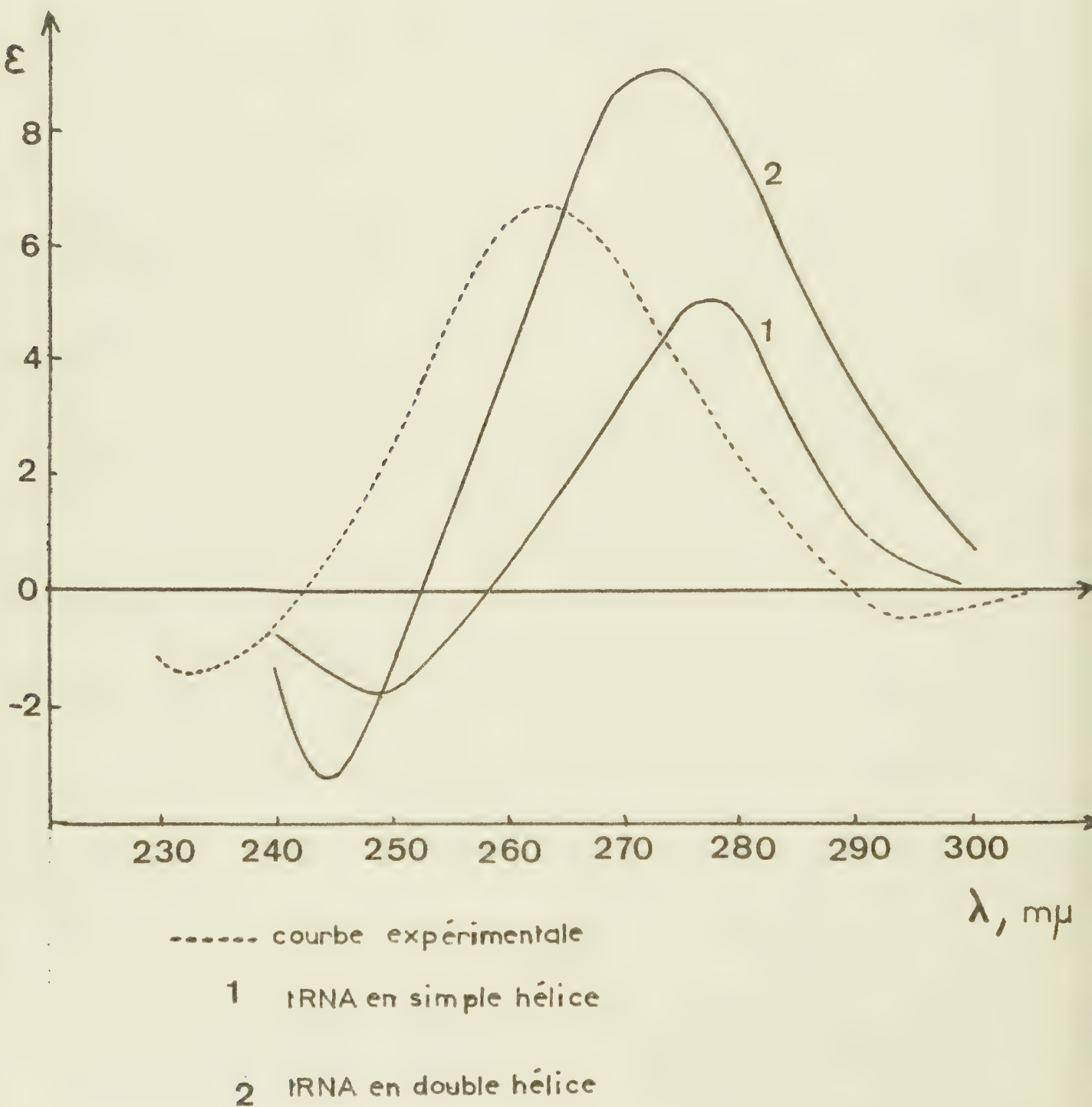
Nous nous sommes placés à des longueurs d'onde différentes et à chaque longueur d'onde nous avons appliqué la relation de CANTOR et TINOCO.

Les courbes obtenues sont représentées dans la figure 18 :

- La courbe en pointillé représente le spectre de D. C. trouvé expérimentalement.
- La courbe (1) correspond au spectre de D. C. du tRNA^{Phe} calculé comme s'il possédait une structure en simple hélice.
- La courbe (2) correspond au spectre de D. C. du tRNA^{Phe} ayant l'appariement maximum en double hélice.

Nous observons une différence importante entre la courbe expérimentale et les courbes calculées, aussi bien en ce qui concerne la forme qu'en ce qui concerne l'intensité des bandes dichroïques. Ce désaccord peut s'expliquer, en partie, par le fait que CANTOR et TINOCO tiennent compte

Figure 18 - ESSAI DE DETERMINATION THEORIQUE DU SPECTRE DE
DICHROISME CIRCULAIRE DU tRNA^{Phe}



seulement des interactions entre plus proches voisins. Cette approximation peut être considérée comme une limitation à leur théorie car ils ne prennent pas en considération les interactions entre voisins les plus lointains qui ne sont sans doute pas négligeables dans les tRNA. En outre, ne connaissant pas le spectre de tous les dinucléotides présents dans la chaîne du tRNA^{Phe}, nous avons été obligés d'en omettre quelques-uns dans le calcul (GpG, UpC, CpU, ApG, par exemple).

L'examen des deux types de courbes nous permet, malgré tout, de souligner la prépondérance des forces rotationnelles positives dans le spectre de D.C. du tRNA. Ce calcul semble confirmer nos résultats thermodynamiques, à savoir que la structure du tRNA est une structure mixte comprenant des régions en simple hélice et des régions en double hélice.

X. MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFERENCE DE CONFORMATION ENTRE UN tRNA NON CHARGE ET UN tRNA CHARGE

Nous avons vu que le dichroïsme circulaire est une méthode très précise et sensible à de petites variations de structure dans le tRNA. C'est pourquoi, dans une dernière série d'expériences, nous avons utilisé cette technique pour essayer de mettre en évidence une différence de conformation entre un tRNA non chargé et un tRNA chargé, dans des conditions de forces ioniques différentes et à diverses températures : 2°, 15° et 22° (figure 19, 20, 21).

a - à faible force ionique, les deux tRNA étant en solution dans du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, il semble y avoir une différence de conformation entre un tRNA non chargé et un tRNA chargé. L'allure du spectre est la même dans les deux cas, mais l'amplitude de la bande dichroïque centrée à 263 mμ est plus intense pour un aminoacyl-tRNA que pour un tRNA déchargé, ceci aussi bien à 2° qu'à 15° ou à 25°.

Figure 19 - DETERMINATION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DE
tRNA NON CHARGÉ ET CHARGÉ EN FONCTION DE LA FORCE
IONIQUE A 2°C

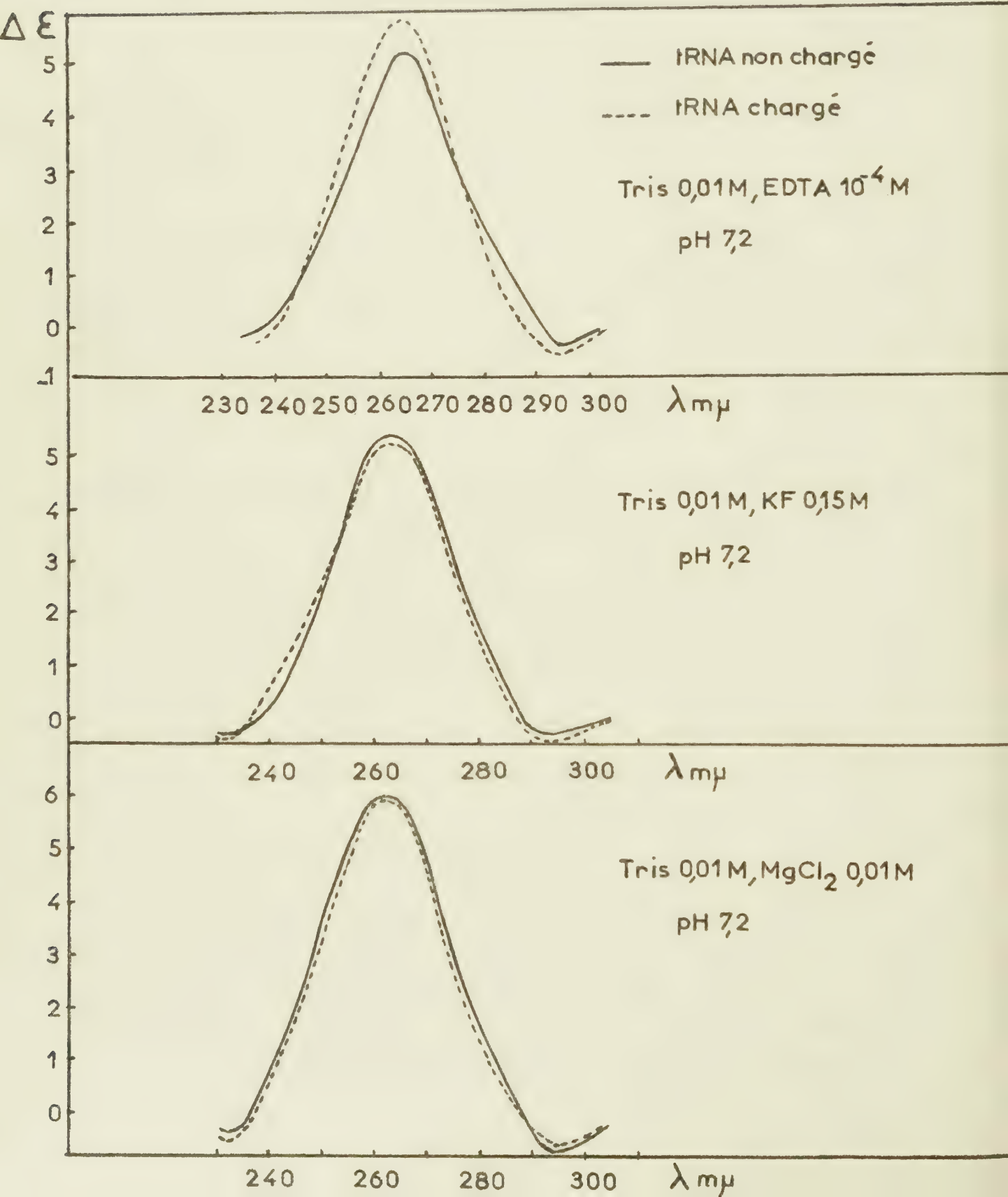


Figure 20 - DETERMINATION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DE
tRNA NON CHARGE ET CHARGE EN FONCTION DE LA FORCE
IONIQUE A 15°C

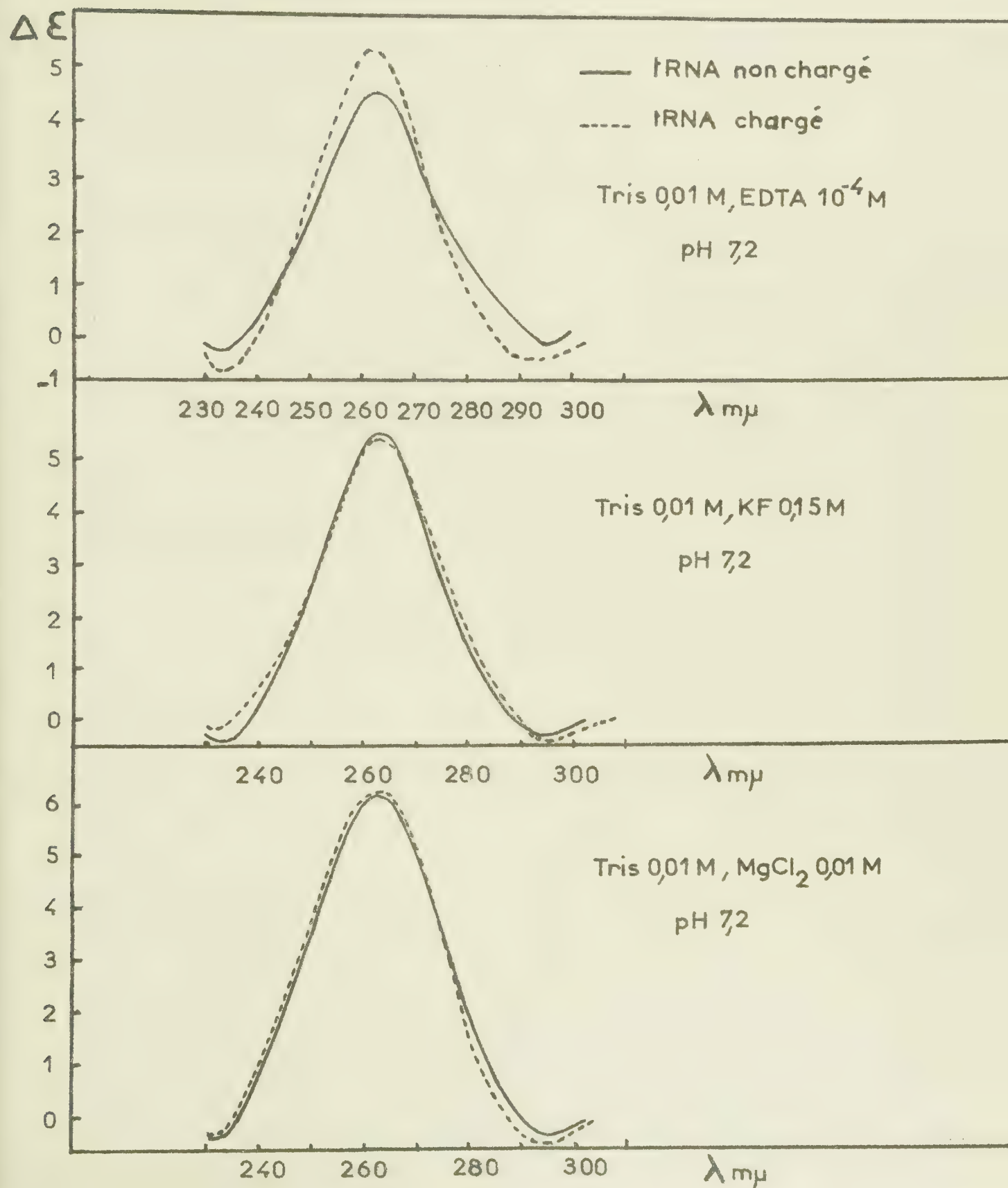
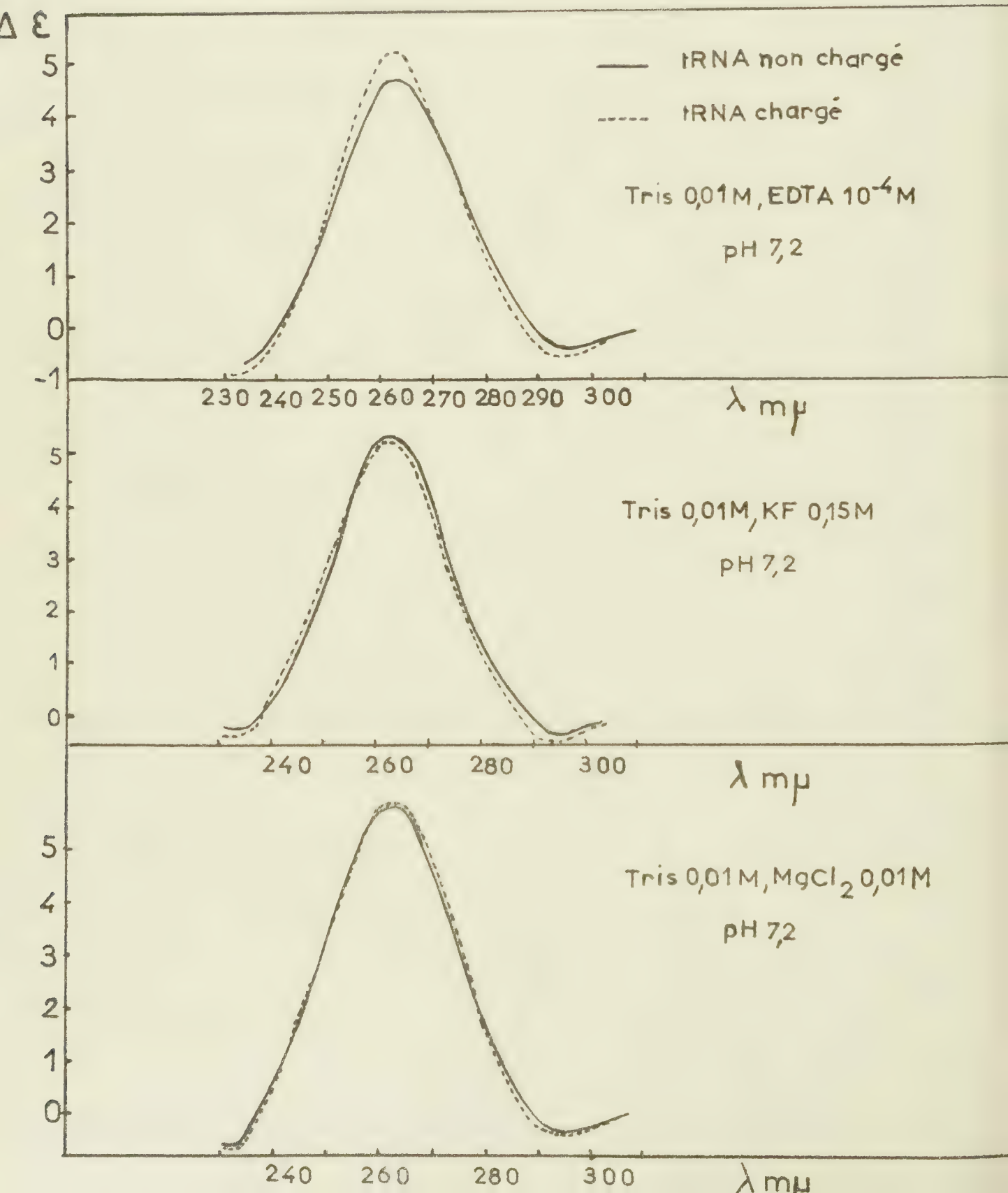


Figure 21 - DETERMINATION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DE tRNA NON CHARGE ET CHARGE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE A 22°C



b - à force ionique plus importante, les tRNA étant en solution dans un tampon Tris-HCl 0,01 M, KF 0,15 M pH 7,2 ou en présence de magnésium (Tris-HCl 0,01 M, $MgCl_2$ 0,01 M pH 7,2), cette différence disparaît. Dans ces conditions, les courbes de D. C. du tRNA non chargé et du tRNA chargé sont identiques ou peuvent être considérées comme telles si l'on tient compte des erreurs d'expérimentation.

Nous savons qu'à faible force ionique il existe à priori des forces de répulsion susceptibles d'écarter les deux brins de la chaîne du tRNA et d'empêcher la formation de la double hélice. On peut imaginer que dans ces conditions de faible force ionique, l'acide aminé est capable de stabiliser la structure du tRNA et plus particulièrement le triplet terminal pCpCpA. Cette stabilisation due à l'acide aminé se traduirait par une augmentation de l'intensité du phénomène de D. C. pour un tRNA chargé. Par contre, à force ionique plus importante ou en présence de magnésium, les ions K^+ ou Mg^{++} seraient suffisants pour stabiliser la structure du tRNA et l'on n'observerait plus de modification du spectre lorsque le tRNA est chargé.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de SARIN et ZAMECNIK (1965) trouvés par une étude de dispersion optique rotatoire sur un tRNA non spécifique. Ces auteurs observent une altération de la structure de l'acide aminé-tRNA. Ainsi, à pH 7 et à force ionique élevée, l'effet COTTON de l'acide aminé-tRNA est égal à 80 p. 100 de celui du tRNA non chargé. Ils aboutissent à la conclusion que le tRNA chargé possède une structure moins hélicoïdale que le tRNA déchargé. La différence entre nos résultats et ceux de SARIN et ZAMECNIK pourrait s'expliquer par le fait que les conditions expérimentales ne sont pas identiques. Ces auteurs opèrent, en particulier, à une force ionique plus importante que la nôtre.

XI. DISCUSSION

Etant donné les grandes difficultés d'obtention des cristaux de tRNA (CLARK et coll., 1968), il est peu probable que la détermination de la structure des tRNA au moyen de R. X. soit faite dans un avenir proche. C'est

pourquoi, les études spectroscopiques et en particulier les études par dichroïsme circulaire s'avèrent de première importance pour la détermination de la conformation tridimensionnelle du tRNA en solution.

Nous avons effectué notre étude suivant deux lignes principales. Nous avons, en premier lieu, établi les données spectroscopiques du tRNA en solution puis nous avons étudié l'effet de la température sur son spectre de dichroïsme circulaire.

Tout d'abord, nous avons déterminé le spectre de D. C. du tRNA dans la région spectrale de 190 m μ à 340 m μ . Cela nous a permis de mettre en évidence une bande positive prépondérante, centrée à 263 m μ , une nouvelle bande positive très intense dans l'UV lointain et une faible bande négative vers 295 m μ . Cette dernière bande a été récemment observée par SARKAR et coll. (1967).

La force ionique et la présence d'ions Mg^{++} augmentent l'intensité du phénomène de D. C., mais quelles que soient les conditions de force ionique, le spectre conserve la même allure générale. Ainsi, on n'observe pas la présence de deux bandes dichroïques identiques mais de signe opposé comme dans le cas du DNA par exemple. Le spectre du DNA étant composé d'une bande positive et d'une bande négative, la loi des forces rotationnelles $\sum R = 0$ est variable. Il est en accord avec la théorie excitonique de TINOCO (1963 et 1964). Ce type de spectre est appelé conservatif.

Le spectre du tRNA, déjà étudié précédemment par MOMMAERTS coll. (1964) est composé d'une seule bande positive dont le maximum (263 m μ) est légèrement déplacé vers les longueurs d'onde supérieures à celle correspondant au maximum d'absorption (258 m μ). Il ne correspond pas, à priori, à la théorie excitonique. La somme des forces rotationnelles n'est pas nulle. Ce type de spectre est appelé non conservatif. Il a fait l'objet d'une étude théorique effectuée par BUSH et BRAHMS (1967) sur des oligocytidylates en simple hélice. Ces auteurs pensent que l'allure du spectre peut s'expliquer par la juxtaposition de deux contributions différentes : une contribution

excitonique, conservative, comme dans le cas du DNA et une contribution non conservative résultant des interactions entre les bandes de l'UV proche et de l'UV lointain dans certaines conditions. Ces résultats complètent les travaux précédents de MOMMAERTS et coll. qui avaient montré que le spectre conservatif du DNA (deux bandes) pouvait être transformé en un spectre non conservatif lorsque le DNA, à faible taux d'humidité (solution alcoolique à 80 p.100), se trouvait sous une forme similaire à la forme A. Dans ces conditions, les deux spectres du DNA et du tRNA sont semblables. Il semble donc que la forme A du DNA, caractérisée par une inclinaison des bases par rapport à l'axe de l'hélice et que la structure du tRNA donnent lieu à une représentation spectrale de type non conservatif.

Récemment, ce problème a été étudié par TINOCO (1968). Il montre par calcul que, dans le cas du tRNA, la courbe de D.C. peut être considérée comme la somme de deux courbes représentant deux types distincts d'interactions : des interactions entre les bandes d'absorption identiques dans les monomères (ces interactions étant les seules à intervenir dans les spectres de type conservatif) et des interactions entre les bandes d'absorption différentes dans les monomères.

Le dichroïsme circulaire peut alors s'exprimer de la façon suivante:

$$\epsilon_g - \epsilon_d = a \epsilon_m(v) + b \frac{d\epsilon_m(v)}{d(v)}$$

où

$$a = \frac{4}{ND_a} \left[\sum_{K=1}^N R_K + \frac{1}{v} \sum_K R_K (v_K - v_a) \right]$$

$$b = -\frac{4}{ND_a} \left[\sum_{K=1}^N R_K (v_K - v_a) \right]$$

c'est-à-dire par l'absorption du monomère et de sa première dérivée.

Le coefficient (a) caractérise les interactions entre les transitions différentes.

Le coefficient (b) caractérise les interactions entre les transitions identiques.

A la suite de ce calcul, TINOCO aboutit à la conclusion que les moments de transition des bases doivent être inclinés par rapport à l'axe de l'hélice. Ce résultat est en accord avec celui de MOMMAERTS et coll. . Il semble donc fort probable que, dans le cas du tRNA, les plans des bases soient inclinés par rapport à l'axe de l'hélice.

L'étude de l'effet de la température sur le spectre de D. C. du tRNA, nous a permis également de montrer que la courbe de "fusion" du tRNA n'avait pas la forme d'une sigmoïde régulière comme c'est le cas pour les oligonucléotides en simple ou en double hélice, mais qu'elle présentait des irrégularités. Nous avons, en effet, constaté une augmentation du maximum d'intensité du D. C. en fonction de la température de 0 à 20° et ensuite une décroissance régulière de l'intensité dichroïque suivant une sigmoïde régulière pour des températures plus élevées. Cet accroissement d'amplitude est d'autant plus accentué que le tRNA est purifié et que la force ionique augmente. En présence de magnésium, il apparaît deux irrégularités.

Ce phénomène étant réversible et non détectable par hyperchromicité, nous avons essayé de l'expliquer par l'existence d'une structure tertiaire. Nous pensons que le tRNA peut présenter une forme repliée où deux boucles de la structure en feuille de trèfle sont reliées par liaison hydrogène, ce qui donne lieu à une structure plus compacte en accord avec les résultats hydrodynamiques de HENLEY et coll. (1966). Ces auteurs ont observé une augmentation de la viscosité du tRNA de levure entre 20° et 40° alors qu'aucune variation de D. O. n'était apparue dans ce domaine de température. Ils attribuent cette légère modification de la viscosité à un changement dans la structure tertiaire du tRNA.

Par ailleurs, CRAMER et coll. (1968) ont montré que la courbe de "fusion" (par hyperchromicité) du tRNA^{Ser} de levure présente deux points de transition, l'un à 39°, l'autre à 63°. Par contre, pour le tRNA^{Phe}, ces auteurs ne trouvent pas d'augmentation de D.O. de 0° à 40°. Ce résultat est en accord avec celui que nous avons trouvé en étudiant la variation de D.O. du tRNA^{Phe} en fonction de la température. CRAMER et coll. interprètent également ce changement de la courbe de "fusion" du tRNA^{Ser} par l'existence d'une structure tertiaire qui se dénaturerait entre 20° et 40°.

Nos résultats peuvent avoir des implications biologiques importantes. Ils peuvent être interprétés comme traduisant l'existence de plusieurs formes de structure tertiaire pour le tRNA (ainsi, en présence de magnésium, deux conformations tertiaires seraient à envisager). Le fait, pour le tRNA, de posséder deux états conformationnels différents devrait faciliter la compréhension des interactions entre tRNA et enzymes dans les systèmes biologiques. Nous avons vu, en effet, que FRESCO et coll. (1966) et SUEOKA et coll. (1966) ont mis en évidence, respectivement chez le tRNA de levure et de E. coli, deux formes structurales réversibles, l'une biologiquement active, l'autre inactive.

A partir de la courbe de "fusion" d'un tRNA total en solution aqueuse, en l'absence de sel, nous avons calculé la valeur de la variation d'enthalpie par la formule de VANT'HOFF. La valeur que nous avons trouvée est supérieure à celle obtenue pour les oligomères en simple hélice. Nous ne pouvons donc pas conclure à une structure en simple hélice pour le tRNA en faible solution ionique. Mais, une valeur similaire de variation d'enthalpie a été trouvée pour des adénylates en double hélice, en particulier pour des heptamères (BRAHMS et VAN HOLDE, 1966). Ceci nous suggère que le tRNA, même dans des conditions qui favorisent la formation d'une structure en simple hélice doit avoir des régions de structure en double hélice comprenant peut-être 3 à 7 bases appariées. Le calcul que nous avons effectué, selon

la méthode de CANTOR et TINOCO, nous conduit à la même conclusion. Ainsi, la structure du tRNA apparaît comme comprenant des régions en double hélice, des régions en simple hélice où la complémentarité des bases ne permet pas l'appariement et finalement des boucles ayant une grande flexibilité.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons étudié la différence de conformation entre un tRNA et un aminoacyl-tRNA. A faible force ionique, il semble que le tRNA chargé ait une structure plus stable que le tRNA non chargé. A force ionique plus importante ou en présence de magnésium, cette différence de conformation disparaît. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'à faible force ionique, l'acide aminé fixé sur le tRNA serait capable d'annuler ou de diminuer l'effet des forces de répulsion qui écarteraient les deux brins de la chaîne polynucléotidique lorsque le tRNA n'est pas chargé. Par contre, les ions K^+ et Mg^{++} seraient suffisants pour stabiliser la structure ordonnée en double hélice du tRNA et l'on n'observerait plus de différence de conformation entre un tRNA non chargé et un tRNA chargé dans ces conditions de force ionique.

En conclusion, nos résultats ne semblent pas être en contradiction avec le modèle en feuille de trèfle proposé par HOLLEY et coll. (1965) pour le tRNA^{Ala}. Nous avons montré que le spectre de D. C. du tRNA est de type non conservatif. La structure du tRNA est donc différente de celle du DNA. Dans le cas du tRNA, les plans des bases sont probablement inclinés par rapport à l'axe de l'hélice.

Nos mesures thermodynamiques et le calcul que nous avons effectué, selon la méthode de CANTOR et TINOCO, nous suggèrent que la structure du tRNA est une structure mixte comprenant des régions en simple et en double hélice.

Finalement, l'interprétation des résultats obtenus après l'étude de la dénaturation thermique du tRNA, nous conduit à faire l'hypothèse que le tRNA possède une structure tertiaire qui pourrait être importante dans la compréhension de ses propriétés biologiques.

TROISIEME PARTIE

EFFET DE LA BROMURATION DU tRNA SUR L'INCORPORATION DES AMINOACIDES DANS LES PROTEINES : ERREURS PROVOQUEES PAR LA BROMURATION DU tRNA

CHAPITRE VII

I. INTRODUCTION

Nous savons que l'acide ribonucléique soluble est un mélange de tRNA qui possèdent tous les propriétés biologiques suivantes :

1) La capacité de fixer spécifiquement un aminoacide déterminé et préalablement activé par l'ATP. Cette fixation se fait en présence d'une aminoacyl-tRNA synthétase spécifique, sur le OH en 2' ou en 3' de l'adénosine terminale du tRNA, par l'intermédiaire d'une liaison ester avec le carboxyl de l'acide amino (SONNENBLICHER et coll., 1963). Un tRNA donné peut fixer un aminoacide et un seul. Il existe donc un site responsable de cette activité. On ne connaît rien quant à la nature de ce site qui doit être reconnu par l'acide amino-tRNA synthétase.

2) La capacité de transférer cet aminoacide dans les protéines en présence de mRNA. Il y a d'abord formation du complexe aminoacyl-tRNA - ribosomes - RNA messager (NIRENBERG et LEDER, 1964). Puis l'acide amino est transféré dans les protéines avec formation de liaisons peptidiques en présence de GTP.

Le mécanisme de cette réaction peut s'expliquer par la théorie de

l'adaptateur de CRICK (1958) et HOAGLAND (1959). Le mRNA peut être considéré comme une suite de codons. Chaque codon est constitué de trois bases (triplet) et représente l'information correspondant à un aminoacide. A chaque codon correspond sur un tRNA donné un anticodon constitué également de trois bases. L'appariement codon-anticodon se fait par liaison hydrogène entre les bases complémentaires. L'anticodon constitue le site responsable de l'activité transférante du tRNA. Nous savons qu'il existe plusieurs tRNA pour un même aminoacide. Cette hétérogénéité est attribuée à la dégénérescence du code, c'est-à-dire, à l'existence de plusieurs codons pour un même aminoacide. Des travaux récents (GHOSH et coll., 1967 ; JONES et coll., 1966 ; NIRENBERG et coll., 1965 ; SÖLL et RAJBHANDARY, 1967 et MIRZABEKOV et coll., 1967) montrent qu'un tRNA peut reconnaître plusieurs codons à condition qu'ils ne diffèrent que par le troisième nucléotide du triplet. CRICK (1966) a fait l'hypothèse que la troisième base du triplet pouvait ne pas être soumise à un appariement classique : A-U et G-C comme c'est le cas pour les deux premières bases et qu'il existerait un flottement (Wobble) au niveau de la reconnaissance du troisième nucléotide.

Mais les interactions codon-anticodon ne suffisent pas à expliquer les phénomènes qui interviennent lors du transfert des aminoacides dans les protéines. Il faut tenir compte aussi des interactions du tRNA avec les ribosomes. Pour la fixation de l'aminoacyl-tRNA aux ribosomes en présence de polynucléotide messager, seules les sous-unités 30S des ribosomes sont nécessaires (KAJI et coll., 1966 et PETSKA et NIRENBERG, 1966). L'incorporation des aminoacides dans les protéines nécessite, elle, la présence de sous-unités 50S car cette partie de la réaction ne peut se faire qu'avec les ribosomes 70S. On sait peu de choses sur la nature des interactions qui ont lieu entre le tRNA et les ribosomes. Le site de fixation du tRNA aux ribosomes pourrait être la séquence Gp-Tp- Ψ p-C commune à tous le tRNA.

3) Une troisième propriété du tRNA est celle de pouvoir détacher et refixer le triplet CpCpA terminal en présence d'un enzyme spécifique : la tRNA-CCA-pyrophosphorylase. Comme le même enzyme peut fixer le triplet CpCpA dans tous les tRNA, il faut admettre qu'il reconnaît un élément structural identique dans tous les tRNA. On ne sait pratiquement rien sur le site que reconnaît cet enzyme dans les tRNA.

Nos connaissances relatives à la nature ou à la localisation des sites responsables des diverses propriétés biologiques du tRNA sont donc très faibles. En fait, le seul élément certain est la participation de l'anticodon à l'incorporation de l'acide aminé dans la position correcte spécifiée par le code.

Nous avons vu, dans l'introduction générale, qu'un moyen d'aborder le problème de la nature des sites était d'étudier l'influence des modifications chimiques sur les différentes activités biologiques du tRNA. Dans notre laboratoire, WEIL et coll. (1964) ont étudié l'effet de la bromuration et de la méthylation sur la capacité acceptrice du tRNA. Leurs résultats pouvaient suggérer que l'anticodon faisait partie intégrante du site accepteur. Leurs travaux ont été poursuivis et complétés. DUVAL (1967) et BEFORT (résultats non publiés) ont étudié respectivement l'effet de l'halogénéation (chloruration et ioduration) et de la nitrosation. Ils aboutissent à la conclusion que les modifications observées sont imputables à des modifications de conformation du tRNA plutôt qu'à des modifications du site responsable de la fixation des acides aminés sur le tRNA. L'interprétation des résultats devient de ce fait très difficile.

L'effet de la bromuration sur la capacité transférante du tRNA a été également effectué par WEIL et coll. (1964). Ils ont montré que la bromuration ainsi que la méthylation provoquaient une chute du transfert des acides aminés dans les protéines. En plus de l'effet quantitatif observé par WEIL et coll., nous avons mis en évidence un effet qualitatif : des erreurs de transfert apparaissent sous l'influence de la bromuration du tRNA.

Nous allons exposer ici, les résultats obtenus en effectuant le transfert des aminoacides après bromuration du tRNA soit en présence de polyribonucléotide synthétique, soit en présence de RNA messenger naturel.

II. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Bromuration du tRNA

Elle a été effectuée selon la technique de DUVAL et EBEL (1965). Le tRNA est précipité sous forme de sel d'ammonium quaternaire par du bromure de triméthylhexadécylammonium selon la méthode décrite par WEIL et EBEL (1962) puis dissous dans le DMF. A cette solution de tRNA est ajouté le brome également dissous dans ce solvant. On laisse agir le brome pendant 30 secondes à 4°. Le tRNA modifié est régénéré sous forme de sel de sodium par addition de 0,25 volume d'une solution de bromure de sodium saturée de DMF. DUVAL et EBEL (1965) ont montré que la bromuration conduisait aux modifications de bases suivantes :

guanine	—————→	8-bromoguanine
uracile	—————→	5-bromouracile
cytosine	—————→	5-bromocytosine
adénine reste inchangée.		

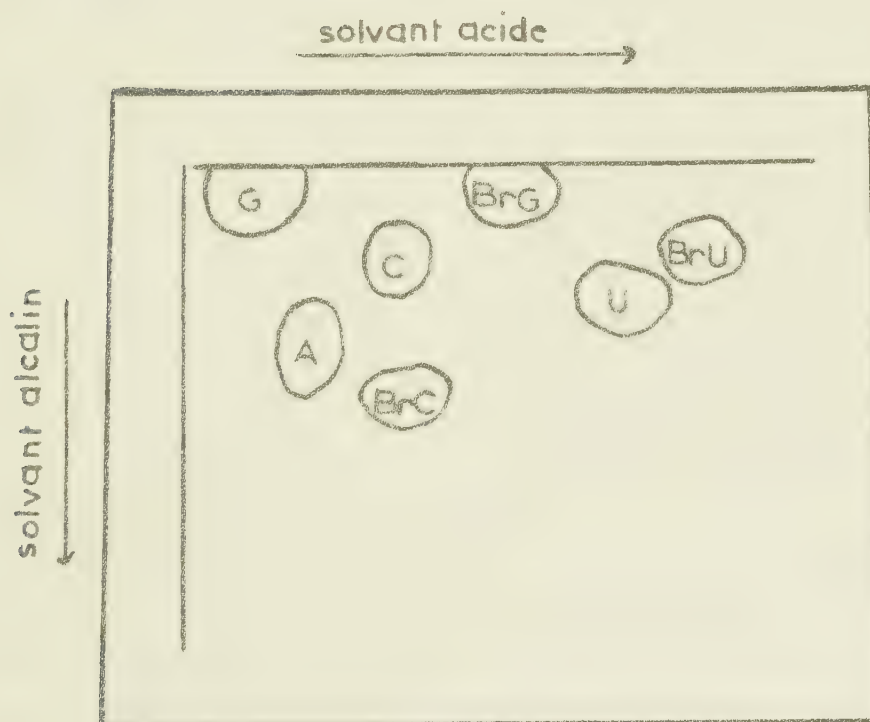
Les pourcentages des bases bromées ont été déterminés par chromatographie bidimensionnelle descendante, sur papier Whatman n°1, après hydrolyse perchlorique du tRNA. Le système de solvant employé est le suivant :

- Solvant I : butanol-isopropanol-HCl concentré-H₂O
(32,5 : 32,5 : 35 : 35 v/v)
durée de migration : 24 h.

- Solvant II : butanol- NH_4OH 6 N (90 : 15 v/v)
durée de migration : 24 h.

Les chromatographies sont réalisées à 20°. Après séchage à température ambiante, les taches sont révélées à l'aide de l'appareil CHROMATO-VUE (modèle C₃, UV Products Inc., San Gabriel, Californie). Elles sont éluées par 5 ml de HCl N pour les dérivés puriques et 5 ml de HCl 0,1 N pour les dérivés pyrimidiques. Les bases normales ou modifiées sont identifiées par leur spectre d'absorption UV et par leur R_f .

Figure 22 - CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES
NORMALES ET BROMÉES



Nous avons étudié le transfert des aminoacides à partir de tRNA bromés à des taux différents (0,25 , 0,5 , 0,75 , 1 et 1,25 mole de brome par nucléotide dans le milieu réactionnel). Nous avons comparé ce transfert à celui obtenu à partir d'un témoin non bromé, mais qui a subi le même traitement dans le DMF.

2) Préparation des ^{14}C -aminoacyl-tRNA

Les ^{14}C -aminoacyl-tRNA ont été préparés selon la technique décrite par VON EHRENSTEIN et LIPMAN (1961). Le milieu réactionnel avait la composition suivante pour un volume final de 10 ml :

tRNA de levure (témoin ou modifié)	:	50 mg
^{14}C -aminoacides	:	400 à 600 m μ moles
Tampon Tris-HCl pH 7,2	:	1 mmole
Acétate de Mg	:	50 μ moles
ATP	:	30 μ moles
Phosphoénolpyruvate de Na 0,01 M pH 7	:	200 μ moles
Pyruvate-kinase	:	0,4 mg (0,04 ml de la préparation BOEHRINGER)
Extrait enzymatique de levure	:	12,5 mg

La quantité d'enzyme employée est la quantité optimale nécessaire pour la fixation de l'acide aminé. La méthode de préparation de l'enzyme de fixation a été décrite au chapitre II.

Après 30 minutes d'incubation à 37°, la réaction est stoppée par addition de 10 ml de phénol saturé d'eau. Après une agitation de 2 heures et une centrifugation à 17 000 tours/minute (dans la centrifugeuse SORVALL refroidie), la phase aqueuse est prélevée. La phase inférieure phénolique est agitée, à nouveau, pendant 15 minutes avec 0,5 volume d'eau distillée. Après centrifugation, la phase aqueuse est recueillie. Les deux phases

aqueuses sont réunies et précipitées par addition de 0,1 volume d'acétate de potassium à 20 p. 100 pH 5 et de 2 volumes d'éthanol 95°.

Le précipité est lavé deux fois par un mélange froid de NaCl 0,1 M (1 volume) - éthanol (2 volumes) puis redissous et dialysé pendant une nuit à 4° contre NaCl 10^{-3} M.

Les résultats de fixation sont exprimés en mpmoles d'acide par mg de tRNA. Les 14 C-aminoacyl-tRNA ainsi préparés sont introduits dans un système acellulaire permettant l'incorporation des acides dans les protéines.

3) Incorporation des aminoacides dans les protéines à partir des aminoacyl-tRNA témoins ou bromés.

Le système d'incorporation des aminoacides dans les protéines a été préparé selon la méthode de NIRENBERG et MATTHAEI (1961) à partir de cellules de E. coli, souche ML 308, cultivées à 37° en fioles à toxine avec agitation. Le milieu stérile contient pour 1 litre d'eau :

K_2PO_4	:	11	g
KH_2PO_4	:	8,5	g
Yeast extract	:	6	g
Glucose	:	10	g

Il estensemencé avec un innoculum provenant d'une préculture faite sur le même milieu. Les cellules récoltées en phase logarithmique de croissance sont recueillies sur de la glace, centrifugées et lavées avec le tampon TSM de composition suivante :

Tris-HCl	:	0,01	M	pH 7,8
Acétate de Mg	:	0,01	M	
KCl	:	0,01	M	
Saccharose	:	0,2	M	
Mercaptoéthylamine	:	0,006	M	

10 g de cellules additionnées de 10 ml de tampon TSM ont été broyées en présence de 30 g de billes de verre de 0,11-0,12 mm de diamètre. Après centrifugation à 17 000 tours/minute, on recueille le surnageant qui constitue l'extrait brut.

a - Préincubation de l'extrait brut

Dans le but de débarrasser l'extrait brut de son RNA messager endogène, on effectue une préincubation dans les conditions suivantes :

Extrait brut	: 15 ml
MgCl ₂ 0,1 M	: 0,31 ml
DNase	: 45 µg
KCl	: 4,5 mg
Mélange d'acides aminés 0,01 M en chaque acide aminé	: 0,11 ml
ATP 0,01 M pH 7	: 2,35 ml
Phosphoénolpyruvate de Na 0,01 M pH 7 (BOEHRINGER)	: 0,45 ml
Pyruvate-kinase (BOEHRINGER)	: 0,03 ml

Le mélange est laissé 45 minutes à 37° puis mis à dialyser pendant 12 heures contre le tampon TSM à 4°. L'extrait préincubé est réparti en plusieurs fractions de 2 à 3 ml chacune et conservé congelé à -20°.

b - Transfert des ¹⁴C-aminoacyl-tRNA dans les protéines

Le milieu réactionnel a la composition suivante pour un volume final de 1,7 ml :

Tris-HCl	: 10 µmoles
ATP	: 1 µmole
Phosphoénolpyruvate de Na 0,01 M pH 7	: 10 µmoles
Pyruvate-kinase	: 0,5 mµmole
KCl	: 146 µmoles
MgCl ₂	: 17 µmoles

^{14}C -aminoacide	:	1	µmole
19 autres aminoacides non radioactifs	:	0,03	µmole de chaque
2-mercaptoéthylamine	:	1,8	µmole
GTP	:	0,3	µmole
Poly U	:	0,1	mg
Extrait enzymatique	:	0,3	ml

Le pH du milieu est ajusté à 7,3. Après 45 minutes d'incubation à 37°, on fait agir la RNase (20 µg) pendant 15 minutes. La réaction est stoppée par addition de 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p.100. Après 30 minutes de précipitation, le précipité recueilli par centrifugation est lavé par 5 ml d'acide trichloracétique à 5 p.100 puis à deux reprises par 5 ml d'acide trichloracétique à 10 p.100 à 90°C pendant 20 minutes. Le précipité final est dissous dans 1 ml de NH_4OH M auquel sont ajoutés 10 ml de mélange scintillateur. La radioactivité est mesurée au compteur TRICARB-PACKARD.

L'addition de RNase au milieu réactionnel a pour effet d'hydrolyser les ^{14}C -aminoacyl-tRNA en excès. Les lavages par l'acide trichloracétique à 90° ont un but analogue. C'est une précaution supplémentaire car, dans ces conditions, seuls les aminoacyl-tRNA sont solubilisés alors que les protéines et les polypeptides sont insolubles.

Dans chaque série d'expériences, nous avons fait un témoin où il n'y a pas de polynucléotide messenger. La radioactivité de ce tube correspond à l'incorporation de l'aminoacide due à la présence de RNA messenger dans l'extrait. Pour mesurer l'incorporation des aminoacides dans les protéines, on soustrait cette valeur à celle correspondant à l'incorporation des aminoacides obtenue en présence de poly U.

Dans le cas où les expériences sont réalisées en présence de RNA messenger naturel, la préincubation de l'extrait brut n'est pas effectuée.

4) Complexe aminoacyl-tRNA-mRNA-ribosomes

Nous avons testé la formation du complexe aminoacyl-tRNA-poly U-ribosomes par la technique de NIRENBERG et LEDER (1964)

a - Préparation des ribosomes de *E. coli*

Après broyage des cellules de *E. coli*, l'extrait brut est centrifugé pendant 2 heures à 105 000 g à l'ultracentrifugeuse Spinco. Le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension au moyen d'un Potter dans un tampon A ajusté à pH 7,2 de composition suivante :

Tris-HCl	: 0,1 M
Acétate de Mg	: 0,02 M
Acétate de potassium	: 0,05 M

Après une nouvelle centrifugation à 105 000 g pendant 2 heures, les ribosomes sont remis en suspension dans un tampon B ajusté à pH 7,2 :

Tris-HCl	: 0,005 M
Chlorure de Mg	: 0,005 M
Chlorure d'ammonium	: 0,005 M

La suspension de ribosomes est à nouveau centrifugée à 105 000 g et les ribosomes sont remis en suspension dans un minimum de tampon B. Ils sont alors dialysés une nuit contre ce tampon à 4°. La suspension est ensuite centrifugée à 17 000 tours/minute pendant 30 minutes.

Le surnageant est réparti en fractions de 1 à 2 ml. Il peut être conservé à -60° pendant une quinzaine de jours sans perdre son activité. Les fractions sont dégelées et testées avant utilisation.

b - Préincubation des ribosomes

Avant utilisation, les ribosomes sont préincubés à 37° pendant 30 minutes. SEEDS et CONWAY (1966) ont, en effet, constaté que cette

préincubation favorisait la formation du complexe aminoacyl-tRNA-ribosomes-mRNA. Après cette préincubation, la suspension est amenée à une D. O. de 400 mesurée à 260 mμ avec le tampon A.

c - Milieu réactionnel

Dans un volume final de 0,05 ml, ce milieu contient :

^{14}C -aminoacyl-tRNA témoins ou bromés	:	10 à 20	μg
Poly U (0,05 ml d'une solution à 5 mg/ml)	:	25	μg
Ribosomes (0,005 ml d'une solution de D. O. 400)	:	2,4	mg
Tampon A 3 x concentré	:	0,015	ml
H_2O q. s. p.	:	0,05	ml

La réaction se poursuit 20 minutes à 24°. Elle est stoppée par refroidissement dans la glace et par dilution avec le tampon A. On filtre sur millipores où est retenu le complexe. On lave trois fois avec le tampon A pour éliminer l'excès de ^{14}C -aminoacyl-tRNA non complexé. Après dissolution de ces millipores dans 10 ml de scintillateur, la radioactivité est mesurée au compteur Fackard-Tricarb. Les valeurs diminuées de celle du blanc (sans ribosomes) sont rapportées à un témoin sans poly U.

Dans le but d'étudier s'il y a une incorporation anormale de l'isoleucyl-tRNA bromé dans le complexe, nous avons opéré sur des quantités 10 fois plus importantes et en présence de 75 μg environ de tRNA enrichi 3 à 4 fois en tRNA^{Ile} par la méthode de KATCHALSKI et coll. (chap. III).

III. RESULTATS

A. EFFETS DE LA BROMURATION DU tRNA SUR L'INCORPORATION DES AMINOACIDES DANS LES PROTEINES EN PRESENCE DE POLY U

Nous avons comparé, en présence de poly U, le transfert de différents aminoacides à partir de tRNA témoins ou bromés au transfert de la phénylalanine dans des conditions identiques.

Tableau IV

TRANSFERT DES AMINOACIDES, EN PRESENCE DE POLY U, APRES BROMURATION DU tRNA AVANT LA FIXATION DE L'AMINOACIDE

Aminoacides	Nombre d'expériences	Quantité de brome ajouté au tRNA dans le milieu réactionnel (en mole de Br par nucléotide)					
		0	0,25	0,5	0,75	1	1,25
Phénylalanine	5	30	28	28,2	-	13,2	-
Acide glutamique	6	0	0,2	0,7	0,8	1,2	0,9
Isoleucine	12	0	0	0,6	1,0	0,8	0,4
Leucine	3	0	-	0	0,7	0,4	-
Lysine	5	0	0	0,4	0,3	0,3	0,2
Valine	14	0	-	0,3	0,3	0,9	0,2
Alanine	3	0	-	0	0	0	-
Acide aspartique	9	0	-	0	0	0	0
Histidine	3	0	-	0,3	0	0	0
Sérine	9	0	0	0	0,1	0,1	0
Thréonine	5	0	-	0	0,1	0,1	0
Glycine	8	0	-	0,2	0,8	0,2	0,9
	2	0	-	-	0	0,1	0
Tyrosine	3	0	-	-	1,4	1,3	2,4
	5	0	-	-	0	0,1	0

Les différentes séries d'expériences ont été effectuées chaque fois avec un lot de tRNA différents. On a mesuré le pourcentage de radioactivité transféré dans les polypeptides à partir des ^{14}C -aminoacyl-tRNA témoins ou bromés. Les moyennes des pourcentages de transfert dans les diverses expériences figurent dans ce tableau.

Les résultats de ces expériences figurent dans le tableau IV.

Nous constatons que l'on observe un transfert de 1 à 2 p. 100 de l'acide introduit sous forme de ^{14}C -aminoacyl-tRNA bromé pour certains aminoacides qui ne sont pas incorporés normalement en présence de poly U. Ce sont l'acide glutamique, l'isoleucine, la leucine, la lysine et la valine. Dans les mêmes conditions, on observe un transfert de la phénylalanine de l'ordre de 30 p. 100. Nous constatons que fréquemment le transfert des aminoacides augmente pour de faibles bromurations, mais qu'il décroît pour des bromurations importantes au-delà de 1 brome par nucléotide dans le milieu réactionnel. Dans ce dernier cas, il se produit une modification de la structure secondaire ou tertiaire du tRNA entraînant une perte d'activité biologique. L'étude des courbes de "fusion" effectuée par DUVAL et EBEL montre, en effet, que pour de fortes bromurations, la structure du tRNA est altérée.

Nous n'observons pas de transfert pour les autres aminoacides étudiés (alanine, acide aspartique, histidine, sérine et thréonine) excepté pour la glycine et la tyrosine où nous avons obtenu des résultats ambigus, tantôt positifs, tantôt négatifs.

Comme la bromuration du tRNA a été effectuée avant l'étape de fixation des aminoacides, on pouvait se demander si ces incorporations anormales ne pouvaient être dues à des modifications de la capacité acceptrice du tRNA. En effet, certaines molécules de tRNA spécifiques de la phénylalanine pourraient, après bromuration, fixer par exemple de l'isoleucine et transférer cet aminoacide dans les protéines en présence de poly U. C'est pourquoi, dans une autre série d'expériences, nous avons fixé l'isoleucine sur le tRNA avant d'effectuer la bromuration. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau V. Dans ces conditions, nous avons étudié uniquement le transfert de l'isoleucine. Nous observons également une incorporation anormale de l'isoleucine à partir de l'isoleucyl-tRNA bromé.

Tableau V

INCORPORATION D'ISOLEUCINE EN PRESENCE DE POLY U
A PARTIR D'ISOLEUCYL-tRNA AYANT ETE BROME APRES
LA FIXATION DE L'ISOLEUCINE

Additions au système acellulaire	Pourcentage d'isoleucine incorporée (moyenne de 4 expé- riences)
+ isoleucyl-tRNA normal (témoin)	0
+ isoleucyl-tRNA bromé I	2,3
+ isoleucyl-tRNA bromé II	2
+ isoleucyl-tRNA bromé III	0,3

Les isoleucyl-tRNA ont été bromés respectivement à raison de 0,5 (tRNA bromé I), 0,75 (tRNA bromé II) et 1 (tRNA bromé III) mole de brome par nucléotide dans le milieu réactionnel.

Dans le tableau figurent les moyennes de pourcentages d'incorporation trouvées dans les différentes expériences.

Nous constatons qu'en effectuant la bromuration après l'étape de fixation de l'acide aminé, les pourcentages de transfert sont supérieurs à ceux observés lorsque l'on bromure le tRNA avant la fixation de l'acide aminé. Ceci s'explique par le fait que la bromuration provoque une chute de la capacité acceptrice du tRNA (EBEL et coll., 1965). Donc, en introduisant dans le milieu réactionnel la même quantité d'acide aminé-tRNA témoin et modifié, nous introduisons plus de tRNA non chargé dans le cas du tRNA bromé que dans le cas du tRNA témoin. Or, il a été constaté dans notre laboratoire par Madame BEFORT (résultats non publiés) et aussi par d'autres auteurs (SO et DAVIE, 1963 ; SEEDS et CONWAY, 1966) que l'addition d'un excès de tRNA non chargé normal ou modifié à un système acellulaire provoque une inhibition du transfert des acides aminés.

En effectuant la bromuration sur l'acide aminé-tRNA, nous évitons cet inconvénient. Par contre, dans ces conditions, nous pouvions bromer non seulement le tRNA mais aussi l'acide aminé et provoquer ainsi des causes d'erreurs supplémentaires dans le transfert. C'est pourquoi, dans nos premières expériences, nous avons effectué la fixation de l'acide aminé sur le tRNA avant l'étape de la bromuration. En définitive, il s'avère que nous obtenons des résultats identiques, que la bromuration soit effectuée avant ou après la fixation de l'acide aminé sur le tRNA. La seule différence est d'ordre quantitatif. On observe, en effet, un pourcentage de transfert d'isoleucine plus élevé lorsque la bromuration est effectuée sur l'isoleucine-tRNA ce qui suggère que l'acide aminé n'est vraisemblablement pas modifié.

B. EFFETS DE LA BROMURATION SUR L'INCORPORATION D'ACIDES AMINÉS EN PRESENCE DE RNA MESSAGER NATUREL

On pouvait se demander si cette incorporation anormale d'acides aminés ne se produisait qu'en présence de poly U ou si elle avait lieu également en présence de RNA messager naturel. Dans ce but, nous avons préparé

Tableau VI

EFFET DE L'ADDITION D'ISOLEUCYL-tRNA BROME A UN SYSTEME
ACELLULAIRE SATURE EN ISOLEUCYL-tRNA NORMAL

Additions au système acellulaire		Pourcentage d'isoleucine incorporée (moyenne de 6 expériences)
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	100
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	95
+ 0,3 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	93
+ 0,3 mg	tRNA bromé I	
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	102
+ 0,3 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé I	
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	94
+ 0,3 mg	tRNA bromé II	
+ 1 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA normal	102,5
+ 0,3 mg	^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé II	

Les six séries d'expériences ont été effectuées chaque fois avec un lot de tRNA différents. Les tRNA ont été bromés par addition respectivement de 0,5 (tRNA bromé I) et 0,75 (tRNA bromé II) mole de brome par nucléotide dans le milieu réactionnel. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité de ^{14}C -isoleucine incorporée lorsque le système ne contient que le ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal en quantité saturante.

à partir d'E. coli, des extraits acellulaires non préincubés afin de conserver leur RNA messenger endogène. Les expériences ont été effectuées uniquement en présence d'isoleucyl-tRNA témoins et bromés.

a - Effet de la bromuration sur l'incorporation anormale de l'isoleucine en présence de mRNA naturel

L'isoleucyl-tRNA bromé renferme vraisemblablement des molécules qui sont encore capables de reconnaître, sur le RNA messenger naturel, le triplet codeur qui correspond normalement à l'isoleucine. En effet, surtout pour de faibles bromurations, l'isoleucyl-tRNA bromé peut contenir des chaînes peu bromées qui sont susceptibles d'assurer un transfert normal d'isoleucine.

Pour mettre en évidence une incorporation anormale, il était donc nécessaire de saturer préalablement le système en isoleucyl-tRNA témoin. Dans ces conditions, l'addition d'un excès d'isoleucyl-tRNA témoin ne provoque plus d'augmentation de la quantité d'isoleucine transférée et nous avons étudié les effets de l'addition d'isoleucyl-tRNA bromé au système saturé.

Nous avons vu, en outre, que la présence d'un excès de tRNA déchargé dans un système accellulaire provoque une baisse du transfert des aminoacides (Madame BEFORT, résultats non publiés). C'est pourquoi, pour chaque addition d'isoleucyl-tRNA bromé au système saturé en isoleucyl-tRNA normal, nous avons fait une expérience témoin où nous avons ajouté au système acellulaire la même quantité du même tRNA bromé mais non chargé.

Dans ces conditions, on constate (tableau VI) que l'addition de tRNA bromé non chargé au système saturé en ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal provoque une chute de la quantité d'isoleucine incorporée (on ne trouve plus que 93 p. 100 de la quantité d'isoleucine incorporée quand seul le ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal est présent dans le système). L'addition de ^{14}C -

Tableau VII

EFFET INHIBITEUR EXERCE PAR L'ADDITION DE
PHENYLALANYL - tRNA SUR L'INCORPORATION DE L'ISOLEUCINE
A PARTIR DU ^{14}C -ISOLEUCYL-tRNA BROME

Additions au système acellulaire	Pourcentage d'isoleucine incorporée (moyenne de 6 expériences)
+ 0,3 mg ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé	100
+ 0,3 mg ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé	94
+ 0,3 mg tRNA normal non chargé	
+ 0,3 mg ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé	62
+ 0,3 mg phénylalanyl-tRNA normal	

Les six expériences ont été réalisées chaque fois avec un lot de tRNA différents. Les tRNA bromés utilisés dans ces expériences ont été obtenus par addition de 0,75 mole de brome par nucléotide dans le milieu réactionnel. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité d'isoleucine incorporée lorsque le système ne contient que le ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé.

isoleucyl-tRNA bromé provoque, elle, une légère augmentation de l'isoleucine incorporée (102 p. 100). Cette augmentation devient significative lorsqu'on la compare à la chute provoquée par la même quantité du même tRNA bromé mais non chargé.

L'addition de ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé à un système saturé en ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal est donc capable de provoquer une incorporation supplémentaire d'isoleucine alors qu'aucune incorporation supplémentaire n'est plus obtenue par addition de ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal. Ce phénomène suggère que l'isoleucyl-tRNA bromé peut reconnaître sur le RNA messenger naturel d'autres codons que ceux reconnus par l'isoleucyl-tRNA normal.

b - Effet compétitif exercé par le phénylalaninyl-tRNA sur l'incorporation anormale de l'isoleucine à partir de l'isoleucyl-tRNA bromé

Comme, d'une part, l'isoleucyl-tRNA bromé semble reconnaître sur le RNA messenger naturel d'autres codons que ceux qui correspondent normalement à l'isoleucine et que, d'autre part, l'isoleucyl-tRNA bromé transfère son aminoacide en présence de poly U, nous avons émis l'hypothèse que l'isoleucyl-tRNA bromé est capable de reconnaître les codons UUU. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à mettre en évidence une compétition entre le phénylalaninyl-tRNA normal (codon normalement reconnu UUU) et l'isoleucyl-tRNA bromé.

Nous avons comparé les effets de l'addition de phénylalaninyl-tRNA normal et celle, dans une expérience témoin, d'une même quantité du même tRNA mais non chargé au système renfermant le ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VIII

INCORPORATION D'ISOLEUCYL-tRNA NORMAL ET D'ISOLEUCYL-tRNA BROME DANS LE COMPLEXE AMINOACYL-tRNA-RIBOSOMES-FOLY U

Expériences	1	2	3
$\mu\text{moles } ^{14}\text{C-isoleucyl-tRNA}$ { normal introduites dans la réaction { bromé	113 113	102 102	71 71
$\mu\text{moles } ^{14}\text{C-isoleucyl-tRNA}$ { normal incorporées dans le complexe { bromé	14,6 18,1	11,2 14,8	3,8 9,3
pourcentage d'augmentation	3,1	3,5	7,7

Dans ces expériences, le tRNA de levure enrichi par la méthode de KATCHALSKI et coll. a été bromé par addition de 0,5 brome par nucléotide dans le milieu réactionnel. Le pourcentage d'augmentation de l'incorporation dans le complexe est défini par le rapport :

$$100 \times \frac{\mu\text{moles isoleucyl-tRNA bromé} - \mu\text{moles isoleucyl-tRNA normal incorporées}}{\mu\text{moles isoleucyl-tRNA introduites dans la réaction}}$$

On constate que l'addition de tRNA normal déchargé au système renfermant uniquement du ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé provoque une légère inhibition (6 p. 100) du transfert de l'isoleucine. Par contre, l'addition de ^{14}C -phénylalanyl-tRNA normal provoque une inhibition beaucoup plus importante (38 p. 100).

L'addition de phénylalanyl-tRNA normal provoque donc une chute de l'incorporation de l'isoleucine à partir de l'isoleucyl-tRNA bromé. Cet effet inhibiteur suggère qu'effectivement il y a compétition entre le phénylalanyl-tRNA normal et l'isoleucyl-tRNA bromé pour les codons UUU. Comme nous avons montré, d'autre part, que l'isoleucine est incorporée dans les protéines en présence de poly U, il semble qu'effectivement l'isoleucyl-tRNA bromé peut reconnaître les codons UUU.

C. EFFET DE LA BROMURATION SUR LA FORMATION DU COMPLEXE AMINOACYL-tRNA-POLY U-RIBOSOMES

Nous avons vu que l'incorporation des aminoacides dans les protéines comporte, d'une part, la fixation des tRNA aux ribosomes en présence de RNA messenger, d'autre part le transfert des aminoacides dans les protéines. Pour essayer de comprendre le mécanisme de l'incorporation anormale que nous observons après bromuration du tRNA, nous avons étudié l'effet de la bromuration sur la formation du complexe ribosomes-aminoacyl-tRNA-poly U. Afin de tester la formation du complexe ribosomes-isoleucyl-tRNA bromé-poly U, le tRNA^{Ile} a été bromé puis chargé en ^{14}C -isoleucine.

Madame BEFORT (résultats non publiés) a montré que la fixation aux ribosomes d'aminoacyl-tRNA normaux ou modifiés était inhibée par la présence d'un excès de tRNA non chargé. Nous avons vu, en outre, qu'en introduisant dans le milieu réactionnel une même quantité d'aminoacyl-tRNA normal ou modifié, nous introduisons plus de tRNA non chargé dans le cas de l'aminoacyl-tRNA modifié que dans le cas de l'aminoacyl-tRNA

normal. C'est pourquoi, nous avons ajouté au milieu renfermant le ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal, une quantité de tRNA non chargé et bromé de façon à obtenir une quantité de tRNA non chargé équivalente à celle qui est présente lorsque le milieu ne renferme que le ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé.

Les résultats figurent dans le tableau VIII.

Nous constatons une fixation du ^{14}C -isoleucyl-tRNA normal aux ribosomes en présence de poly U. Mais, cette fixation est plus importante dans le cas du ^{14}C -isoleucyl-tRNA bromé.

Nous avons également testé la formation du complexe ribosomes-poly U-alanyl-tRNA bromé. Cette expérience a été effectuée une seule fois avec un tRNA^{Ala} purifié par distribution en contre-courant, bromé, à raison de 0,5 mole de Br par nucléotide dans le milieu réactionnel, puis chargé en ^{14}C -alanine. Nous n'avons observé aucune incorporation du ^{14}C -alanyl-tRNA normal ou bromé dans le complexe en présence de poly U. Or, nous avons constaté que l'isoleucine était incorporée dans les protéines en présence de poly U alors que l'alanine ne l'était pas.

Les erreurs de code décrites dans l'incorporation des aminoacides dans les protéines se retrouvent donc au niveau de la formation du complexe aminoacyl-tRNA-RNA messenger-ribosomes.

IV. DISCUSSION

Nous avons montré dans ce travail qu'après bromuration du tRNA d'autres aminoacides que la phénylalanine pouvaient être incorporés dans les protéines en présence de poly U, en particulier l'isoleucine. L'incorporation anormale de cet aminoacide se produit également en présence de RNA messenger naturel.

De nombreux auteurs ont mis en évidence des ambiguïtés au niveau du code génétique. SZER et OCHOA (1964) ont pu obtenir l'incorporation

d'isoleucine en présence de poly U, soit en augmentant la concentration en Mg^{++} , soit en abaissant la température : conditions qui augmentent la capacité du poly U à former des complexes et qui permettent peut-être la formation d'un complexe suffisamment stable entre le poly U et les deux A de l'anticodon UAA admis pour l'un des tRNA spécifique de l'isoleucine.

Par ailleurs, DAVIES et coll. (1964) et OLD et GORINI (1965) ont observé une stimulation de l'incorporation de l'isoleucine, de la sérine et de la leucine en présence de poly U, en augmentant la concentration en ions Mg^{++} et en introduisant dans le milieu réactionnel de la streptomycine. Ces auteurs suggèrent que la streptomycine provoque une modification du site ribosomal où a lieu la formation du complexe RNA messenger-aminoacyl-tRNA permettant ainsi à un aminoacyl-tRNA erroné d'entrer dans le complexe.

SO et DAVIE (1964) et SARIN et ZAMECNIK (1965 a) ont mis également en évidence une incorporation anormale d'isoleucine, de sérine et de tyrosine en faisant varier la concentration en ions Mg^{++} et en polyribonucléotide messenger en présence de solvants organiques. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs font appel à la tautomérisation qui existe entre la forme énolique et la forme cétonique de l'uracile. Un uracile sous forme cétonique pourrait s'apparier par liaison hydrogène à un uracile sous forme énolique ou bien à une guanine. En effet, le rapport forme énolique/forme cétonique d'un tautomère donné, en solution, est, à l'équilibre, fonction de la polarité du solvant. Ce rapport est d'autant plus grand que le solvant est moins polaire. Donc, en milieu organique, une modification de structure, soit du tRNA, soit du RNA messenger, serait possible.

Nos expériences apportent un nouveau moyen de changer les propriétés de transfert des tRNA : elles montrent qu'il est possible, par modification chimique d'un tRNA, de provoquer des erreurs de code lors de la traduction. Nos résultats sont à mettre en relation avec ceux de CARBON et coll. (1968) qui, après désamination nitreuse du tRNA^{Gly}, reconnaissant le codon GGA, ont observé des phénomènes analogues aux nôtres. Ils ont

montré que, dans ces conditions, la glycine pouvait être incorporée dans les protéines en présence de poly AG alterné. Ce polynucléotide messager permet normalement l'incorporation de l'arginine et de l'acide glutamique dans les protéines. Cette modification des propriétés transférantes est due à une transformation de l'anticodon CCU du tRNA^{Gly} en UCU et non à une fixation erronée de la glycine sur le tRNA^{Arg} ou le tRNA^{Glu}.

Nous pouvons rapprocher ces phénomènes d'erreurs de code de ceux qui se produisent lors des mutations suppressives. Les expériences de CAPPECCHI et coll. (1965) ont confirmé l'hypothèse que la mutation suppressive est due à l'apparition d'un tRNA ayant des propriétés codantes nouvelles et qui est ainsi capable de reconnaître un codon non sens. GOODMAN et coll. (1968) ont d'ailleurs déterminé la séquence nucléotidique des tRNA⁺_{III} et su⁻_{III} spécifiques de la tyrosine chez E. coli. Ils ont montré que le tRNA⁻_{III} a pour anticodon AUG et reconnaît le codon UAC spécifiant la tyrosine alors que le produit du gène muté, en l'occurrence le tRNA⁺_{III}, a pour anticodon AUC et reconnaît le codon UAG qui est normalement le codon non sens. REVEL et LITTAUER (1966) ont montré, d'autre part, qu'un tRNA^{Phe} déficient en groupement méthyle (obtenu à partir d'un mutant de E. coli carencé en méthionine) s'apparie beaucoup mieux que le tRNA^{Phe} normal avec les copolymères poly UC et poly UA. Ces auteurs font également le rapprochement entre ce tRNA^{Phe} déficient en groupement méthyle, capable de provoquer des erreurs de code, et les tRNA aux propriétés codantes modifiées rendus responsables des mutations suppressives.

Dans les expériences de REVEL et LITTAUER et de GOODMAN et coll., le tRNA ayant des propriétés codantes modifiées est un tRNA apparaissant in vivo, alors que dans nos expériences et dans celles de CARBON et coll., il s'agit d'un tRNA modifié chimiquement in vitro.

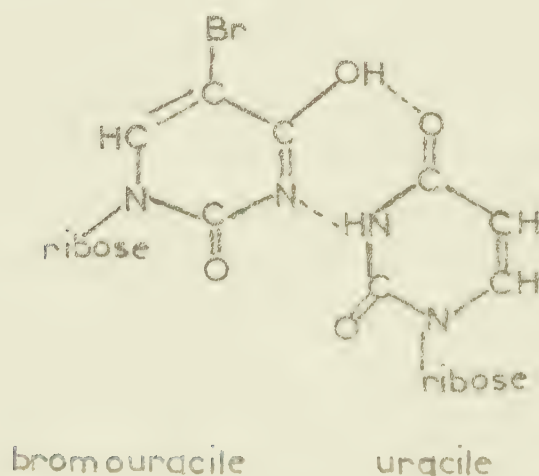
Dans notre laboratoire, EBEL et coll. (1965), WEIL et coll. (1966) et GIEGE et coll. (1969) ont également obtenu des tRNA aux propriétés acceptrices et transférantes modifiées par incorporation de 5-fluorouracile après culture de la levure en présence de cet analogue.

Les résultats obtenus en faisant "le test de reconnaissance" de LEDER et NIRENBERG nous indiquent que la bromuration affecte les interactions impliquées dans la formation du complexe aminoacyl-tRNA-poly U-ribosomes. En effet, un isoleucyl-tRNA bromé se fixe mieux aux ribosomes en présence de poly U que l'isoleucyl-tRNA normal. Mc LAUGHLIN et GRUNBERG-MANAGO (1965), PETSKA (1966) et PETSKA et coll. (1966) ont également observé une meilleure fixation de l'isoleucyl-tRNA aux ribosomes en présence de streptomycine ou en augmentant la concentration en ions Mg^{++} . Les erreurs de code au niveau de l'incorporation des aminoacides dans les protéines se retrouvent donc au niveau de la formation du complexe de NIRENBERG et LEDER.

Il convient maintenant de discuter les diverses explications qui peuvent être données à l'incorporation anormale d'aminoacides que nous avons observée après bromuration du tRNA, aussi bien en présence de poly U qu'en présence de RNA messenger naturel. Nous pouvons tout de suite éliminer la possibilité d'une erreur au niveau de la fixation c'est-à-dire la fixation d'un aminoacide erroné sur le tRNA spécifique de la phénylalanine. En effet, la bromuration du tRNA ayant déjà fixé l'aminoacide entraîne les mêmes erreurs. Il convient donc de rechercher l'explication directement au niveau des réactions de transfert. Deux hypothèses peuvent être formulées : les erreurs consécutives à la bromuration peuvent être dues, soit à une modification de l'anticodon, soit à un changement de la conformation générale de la molécule de tRNA.

Dans la première hypothèse, l'incorporation anormale des aminoacides pourrait s'expliquer si certains nucléotides de l'anticodon pouvaient, après bromuration, acquérir des propriétés d'appariement différentes. Les tRNA correspondant aux aminoacides incorporés en présence de poly U renferment dans leur anticodon l'adénine, l'uracile et la cytosine. L'adénine n'est pas bromée. Elle peut donc toujours s'apparier avec l'uracile. Mais,

il se pourrait qu'après bromuration l'uracile et la cytosine puissent acquérir la propriété de s'apparier avec l'uracile et jouer ainsi le rôle de l'adénine. Ceci serait en accord avec les travaux de GRUNBERG-MANAGO et MICHELSON (1964) qui ont montré que l'isoleucine pouvait être incorporée en présence de poly BrU et la thréonine en présence de poly BrC, comme si BrU et BrC pouvaient jouer le rôle de l'adénine. Ces auteurs ont d'ailleurs proposé un schéma comparant l'appariement normal A-U aux appariements BrU-U et BrC-C dans lesquels une liaison hydrogène pourrait éventuellement être considérée entre le brome et le groupement NH de l'uracile ou de la cytosine. Actuellement, cette hypothèse semble toutefois peu plausible. Une explication serait que la bromuration provoque une énoISATION de l'uracile ou de la cytosine qui permettrait l'appariement par liaison hydrogène de l'uracile et du bromouracile ou de la cytosine et de la bromocytosine suivant le schéma suivant :



Lorsque l'on examine les anticodons généralement admis pour les tRNA correspondant aux aminoacides non incorporés en présence de poly U, on constate qu'ils contiennent la guanine. Il semble donc que la présence de la guanine dans les anticodons empêche, après bromuration du tRNA, toute incorporation des aminoacides correspondants en présence de poly U. Il en résulte que si de nouvelles propriétés d'appariement avec

les codons des RNA messagers apparaissent, elles doivent se limiter à BrU ou BrC. Il s'agirait alors d'un phénomène comparable à la modification de l'anticodon par l'acide nitreux décrite par CARBON et coll. et à la modification de l'anticodon après mutation suppressive (GOODMAN et coll., 1968) qui toutes deux entraînent également des modifications de code.

Dans la deuxième hypothèse, la bromuration provoque une modification de la forme de la molécule de tRNA spécifique permettant un appariement de bases inhabituel entre le tRNA bromé et le RNA messager au niveau des ribosomes. Certains nucléotides situés en-dehors de l'anticodon pourraient, à la suite de la modification de la configuration du tRNA, s'apparier avec les codons UUU du poly U ou du RNA messager naturel.

Cette hypothèse d'une modification de la conformation des tRNA ne peut être écartée car DUVAL et EBEL (1965) ont montré, par l'étude des courbes de "fusion" des tRNA sous l'influence d'un taux de bromuration croissant, que la structure secondaire des tRNA bromés était progressivement altérée. Il a été démontré dans notre laboratoire (WEIL et coll., 1964) que les propriétés biologiques des tRNA (capacités acceptrice et de transfert) étaient affectées sous l'influence de cette modification chimique. Le problème s'est posé de savoir si cette altération des propriétés biologiques était due à l'atteinte d'un site spécifique ou à la modification de la conformation de la molécule. Une étude effectuée par Madame BEFORT (résultats non publiés) de l'effet de la bromuration sur la capacité acceptrice des tRNA a fourni à ce point de vue des résultats très intéressants. On constate que cette modification provoque une décroissance de la fixation des divers aminoacides sur le tRNA, mais cette décroissance est différente pour les divers aminoacides. C'est ainsi que l'on trouve d'une manière reproductible que la fixation de la phénylalanine, de l'arginine, de l'asparagine et de la valine est moins affectée par la bromuration du tRNA que celle de la thréonine, de la leucine, de la glutamine et de l'acide glutamique. L'isoleucine se place entre ces deux catégories avec d'autres aminoacides tels

que la proline et la lysine. L'étude de l'effet d'autres réactions d'hologénéation (chloruration : DUVAL et EBEL, 1965 ; ioduration : YOSHIDA, DUVAL et EBEL, 1966) ou d'autres types de modification chimique comme, par exemple, l'allylation (BOLLACK et coll., 1965) a mis en évidence un ordre de décroissance de la capacité acceptrice voisin de celui donné par la bromuration quoique les bases modifiées par ces divers agents chimiques ne soient pas les mêmes. Ce phénomène ne peut s'interpréter que par l'atteinte d'une caractéristique commune et on est amené à penser à une modification de la configuration des tRNA. Des résultats récents de Madame BEFORT, effectués en collaboration avec Monsieur WERENNE (1968), apportent un argument sérieux en faveur de cette argumentation. Ces auteurs ont, en effet, montré que l'addition aux tRNA de proflavine ou de bromure d'éthidium, composés produisant une altération de la conformation des tRNA en s'intercalant entre les plateaux des bases, conduit à une baisse de la fixation des aminoacides dans un ordre présentant quelques analogies avec celui donné par les réactions d'halogénéation et d'allylation. On constate par exemple que la thréonine, la leucine, la glutamine et l'acide glutamique sont, là aussi, les aminoacides dont la fixation sur les tRNA est la plus diminuée, tandis que l'isoleucine, la lysine et la proline se retrouvent dans une classe intermédiaire d'aminoacides dont la fixation est moins affectée. Il résulte de ces études que la chute de la capacité acceptrice observée après bromuration des tRNA semble être moins la conséquence d'une atteinte spécifique de certaines bases que d'une modification, plus ou moins facile suivant les tRNA étudiés, de la conformation de ces tRNA.

Si on attribue à une modification de la conformation des tRNA la chute de la capacité de fixation de l'isoleucine, cette interprétation doit aussi s'appliquer dans le cas de la capacité de transfert. On ne peut pas écarter l'hypothèse que la formation des complexes anormaux entre ribosomes-poly U-isoleucyl-tRNA bromés soit due à une modification générale de la conformation du tRNA^{Ile} sous l'influence de la bromuration faisant

ainsi apparaître de nouvelles zones d'appariement.

Il apparaît, à la suite de ces résultats, que l'interprétation des phénomènes observés est assez délicate et qu'il est difficile de décider si l'altération des activités biologiques après bromuration des tRNA (dans notre cas, l'apparition d'erreurs dans la traduction du code) est due à la modification du site responsable de l'activité en question ou à une altération de la conformation spatiale native de la molécule de tRNA. Dans nos expériences, un argument en faveur de la modification des propriétés d'appariement des bases de l'anticodon après bromuration pourrait être le fait que la bromuration de l'uracile dans le poly U, fonctionnant comme un RNA messenger, provoque une erreur dans la lecture du code (GRUNBERG-MANAGO et MICHELSON, 1964) identique à celle que nous observons, c'est-à-dire le remplacement de la phénylalanine par l'isoleucine. Mais, la modification de conformation de tRNA après bromuration est certaine et il n'est pas possible de ne pas en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

RESUME ET CONCLUSION

Ce travail représente une contribution à l'étude des relations entre la conformation et les propriétés biologiques des tRNA de levure.

Dans la première partie de notre travail, nous avons exposé la mise au point des différentes méthodes de fractionnement que nous avons utilisées pour isoler les tRNA spécifiques de la phénylalanine et de l'isoleucine.

Le tRNA^{Phe} a été préparé par distribution en contre-courant des tRNA de levure de bière, dans les conditions décrites par DIRHEIMER et EBEL (1967). Nous avons obtenu, en une seule étape, un tRNA^{Phe} avec un degré de pureté de 80 p. 100.

Pour l'isolement du tRNA^{Ile}, nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode de distribution en contre-courant et par la méthode de KATCHALSKI et coll. (1966) mise au point pour la purification du valine-tRNA de *E. coli*. Le fractionnement par contre-courant du tRNA de levure de bière conduit à l'obtention de deux tRNA^{Ile} qui peuvent être ensuite recueillis avec un degré de pureté de 20 à 50 p. 100 selon les cas.

Dans la technique de KATCHALSKI, la fonction amine de l'isoleucine fixée sur le tRNA sert d'initiateur à la polymérisation de l'anhydride du benzyl-N-carboxy-L-aspartate dissous dans le dioxane. Le tRNA^{Ile} est isolé à partir du poly- β -benzyl-L-aspartate-isoleucyl-tRNA par action prolongée de la pronase qui hydrolyse la liaison polypeptidique formée. En appliquant strictement au fractionnement des tRNA de levure de boulangerie les conditions décrites par KATCHALSKI et coll., nous n'avons obtenu qu'un tRNA très faiblement purifié. C'est pourquoi, nous avons été amenés à effectuer une étude systématique des conditions de la réaction de polymérisation. Malgré les modifications apportées à cette technique, nous n'avons

pas pu obtenir un tRNA^{IIc} enrichi de plus de 3 à 4 fois par rapport au tRNA initial avec un rendement supérieur de 1 à 2,5 p. 100.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons effectué une étude de la conformation des tRNA de levure par dichroïsme circulaire. Nous avons, en premier lieu, étudié les données spectroscopiques des tRNA en solution. L'allure générale du spectre de dichroïsme circulaire ne varie pas en fonction de la force ionique, ni en fonction de la concentration en magnésium. Ce spectre est caractérisé par l'existence de deux bandes positives prépondérantes, l'une centrée à 263 m μ , l'autre située dans l'UV lointain centrée à 190 m μ . Nous avons également mis en évidence une faible bande négative vers 295 m μ . Ce type de spectre non conservatif est contraire à la théorie excitonique de TINOCO (1963) qui prévoit l'existence de deux bandes identiques mais de signe opposé comme dans le cas du DNA par exemple. L'allure du spectre peut s'expliquer par la juxtaposition de deux contributions différentes, l'une conservative (cas du DNA), l'autre non conservative qui pourrait être due à des interactions entre l'UV lointain et l'UV proche. L'étude théorique de ce spectre (TINOCO, 1968) aboutit à la conclusion que dans le cas du tRNA les plans des bases sont inclinés par rapport à l'axe de l'hélice.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié l'effet de la température sur le spectre de dichroïsme circulaire du tRNA. La courbe de "fusion" du tRNA n'a pas la forme d'une sigmoïde régulière, mais présente des irrégularités. De 0° à 20°, nous observons une augmentation du maximum d'intensité du dichroïsme circulaire en fonction de la température, puis une décroissance de l'intensité dichroïque pour des températures élevées. Cet accroissement d'amplitude est plus intense lorsque le tRNA est purifié à force ionique importante et en présence de magnésium.

Nous avons montré que ces irrégularités étaient un phénomène réversible qui ne dépendait pas de la structure secondaire du tRNA. Nous

avons essayé d'interpréter ces résultats par l'existence d'une structure tertiaire qui pourrait être importante pour la compréhension des propriétés biologiques des tRNA.

A partir de la courbe de "fusion", nous avons également calculé la variation d'enthalpie du tRNA en solution faiblement ionisée. La valeur que nous avons trouvée, inférieure à celle obtenue pour les oligonucléotides en simple hélice, ne nous a pas permis de conclure à l'existence d'une structure complètement en simple hélice pour le tRNA en solution faiblement ionique. Mais, cette valeur est similaire à celle trouvée pour les oligoadénylates en double hélice. Ce dernier résultat suggère que, même dans des conditions où la formation d'une structure en simple hélice est favorisée, le tRNA doit avoir des régions en double hélice.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons étudié la différence de conformation entre un tRNA chargé et un tRNA non chargé. A force ionique faible, l'aminoacyl-tRNA semble plus stable que le tRNA non chargé. A force ionique plus importante ou en présence d'ions Mg^{++} , cette différence disparaît. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'à faible force ionique, l'acide aminé serait capable d'annuler les forces de répulsion qui écarteraient les deux brins de la chaîne polynucléotidique et qui empêcheraient la formation de la double hélice lorsque le tRNA n'est pas chargé. Par contre, les ions K^+ et Mg^{++} seraient suffisants pour stabiliser la structure en double hélice du tRNA et l'on n'observerait plus de différence entre un tRNA non chargé et un aminoacyl-tRNA.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons étudié l'effet d'une modification chimique, la bromuration, sur l'activité de transfert des tRNA. Les tRNA ont été bromés en milieu diméthylformamide selon la technique de DUVAL et EBEL (1965). Nous avons montré qu'après bromuration du tRNA, d'autres acides aminés que la phénylalanine pouvaient

être incorporés dans les protéines en présence de poly U, en particulier l'isoleucine. L'incorporation anormale de cet aminoacide est observée également en présence de RNA messenger naturel. Nous avons montré, d'autre part, que l'isoleucyl-tRNA bromé provoquait une inhibition de l'incorporation de la phénylalanine dans les protéines et qu'il était donc capable de reconnaître les codons UUU de la phénylalanine.

Dans le but d'essayer d'expliquer le mécanisme de l'incorporation anormale des aminoacides, nous avons étudié l'influence de la bromuration sur la formation du complexe ribosomes-poly U-isoleucyl-tRNA. Nous avons constaté une fixation aux ribosomes, en présence de poly U, de l'isoleucyl-tRNA enrichi par la technique de KATCHALSKI et coll. (1966). L'erreur de traduction du code génétique se retrouve donc au niveau de la formation du complexe de NIRENBERG et LEDER.

Nous avons discuté des résultats en fonction de deux hypothèses : ces erreurs peuvent être dues soit à des modifications au niveau de l'anticodon, soit à une modification de la conformation générale de la molécule des tRNA après bromuration.

B I B L I O G R A P H I E

- APPLEQUIST, J. et DAMLE, V. (1965), J. Am. Chem. Soc., 87, 1450.
- ADAMS, A., LINDAHL, T. et FRESCO, J.R. (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1684.
- AMES, B.N. et DUBIN, D.T. (1960), J. Biol. Chem., 235, 769.
- APGAR, S., HOLLEY, R.W. et MERRILL, S.H. (1962), J. Biol. Chem., 237, 796.
- ARMSTRONG, A., HAGOPIAN, H., INGRAM, V.M. et WAGNER, E.K. (1966) Biochemistry, 5, 3027.
- AUBEL-SADRON, G., BECK, G., EBEL, J.P. et SADRON, CH. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 42, 542.
- AUBEL-SADRON, G., BECK, G. et EBEL, J.P. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 53, 11.
- BAEV, A.A., VENKSTERN, T.V., MIRZABEKOV, A.D., KRUTILINA, A.I., AXELROD, V.A., LI, L. et ENGELHARDT, V.A. (1966) Third Symp. Fed. Europ. Biol. Soc., Varsovie.
- BAEV, A.A., FODOR, I., MIRZABEKOV, A.D., AXELROD, V.D. et KASARINOVA, L.Ya. (1967), Molekularnaya Biologiya, 1, 859.
- BAGULEY, B.C., BERGQUIST, P.L. et RALPH, R.K. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 108, 139.
- BEFORT, N. (1968) Résultats non publiés.
- BEFORT, N. et WERENNE, J. (1968), Résultats non publiés.
- BERGQUIST, P.L., BAGULEY, B.C., ROBERTSON, J.M. et RALPH, R.K. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 108, 531.
- BERGQUIST, P.L. (1966), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 435.
- BERNARDI, G. (1965), Nature, 206, 779.
- BOEDTKER, H. (1960), J. Mol. Biol., 2, 171.
- BOLLACK, C., KEITH, G. et EBEL, J.P. (1965), Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 765.
- BONNET, J., DIRHEIMER, C. et EBEL, J.P. (1969) Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.
- BRADLEY, D., TINOCO, I. Jr et WOODY, R.W. (1963), Biopolymers, 1, 239.

- BRAHMS, J. (1963), J. Am. Chem. Soc., 85, 3298.
- BRAHMS, J. (1964), Nature, 202, 797.
- BRAHMS, J., MICHELSON, A.M. et VAN HOLDE, K.E. (1966), J. Mol. Biol., 15, 467.
- BRAHMS, J. et SADRON, Ch. (1966), Nature, 212, 1309.
- BRAHMS, J., MAURIZOT, J.C. et MICHELSON, A.M. (1967), J. Mol. Biol., 25, 481 et 465.
- BROSTOFF, S.W. et INGRAM, V.M. (1966), Science, 158, 666.
- BROWN, G.L. et ZUBAY, G. (1960), J. Mol. Biol., 2, 287.
- BROWN, G.L., BROWN, A.V.W. et GORDON, J. (1961), BROOKHAVEN Symp. Biol., 12, 47.
- BUSH, C.A. et BRAHMS, J. (1967), J. Chem. Phys., 46, 79.
- CANTONI, G.L. (1960), Nature, 188, 300.
- CANTOR, C.R. et TINOCO, I. Jr (1965) J. Mol. Biol., 13, 65.
- CANTOR, C.R., JASKUNAS, S.R. et TINOCO, I. Jr (1966) J. Mol. Biol., 20, 39.
- CAPPECCHI, M. et GUSSIN, G. (1965), Science, 149, 417.
- CARBON, J.A. et CURRY, J.B. (1968), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 59, 467.
- CHARGAFF, E. et ZAMENHOF, S. (1948), J. Biol. Chem., 173, 327.
- CHERAYIL, J.D. et BOCK, R.M. (1965) Biochemistry, 4, 1174.
- CLARK, B.F.C., DOCTOR, B.P., HOLMES, K.C., KLUG, A., MARCKER K.A., MORRIS, S.J. et PARADIES, H.H. (1968), Nature, 219, 1222.
- CONNELLY, C.M. et DOCTOR, B.P. (1966), J. Biol. Chem., 241, 715.
- CRICK, F. (1956), Biochem. Soc. Symp., 14, 25.
- CRICK, F. (1958), Soc. Exp. Biol. Symp. XII, Cambridge, University Press.
- CRICK, F. (1966), J. Mol. Biol., 19, 548.
- CRAMER, F. (1967), Angew. Chem., 79, 653.
- CRAMER, F., DOEPNER, H., HAAR, F.v.d., SCHLIMME, E. et SEIDEL, H. (1968), Phys. Natl. Acad. Sci. U.S., 61, 1384.
- DAVIES, J., WILBERT, W. et GORINI, L. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51, 883.

- DAVIS, R. et TINOCO, I. Jr (1967), *Biopolymers*, 6, 223.
- DE VOE, H. et TINOCO, I. Jr (1962), *J. Mol. Biol.*, 4, 518.
- DIRHEIMER, G. et KUNTZEL, B. (1966), *Bull. Soc. Pharm. Strasbourg*, 9, 97.
- DIRHEIMER, G. et EBEL, J. P. (1967), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49, 1679.
- DIRHEIMER, G., SABEUR, G. et EBEL, J. P. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 149, 587.
- DIRHEIMER, G. (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 1221.
- DOCTOR, B. P. et CONNELLY, C. M. (1961), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 6, 201.
- DOTY, P., BOEDTKER, H., FRESCO, J. R., HASELKORN, R. et LITT, M. (1959), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45, 482.
- DUBE, S. K., MARCKER, K. A., CLARK, B. F. C. et CORY, S. (1968), *Nature*, 218, 232.
- DUVAL, J. et EBEL, J. P. (1964), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46, 1059.
- DUVAL, J. et EBEL, J. P. (1965), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, 787.
- DUVAL, J. et EBEL, J. P. (1966), *C.R. Acad. Sci. Paris*, 263, 1773.
- DUVAL, J. et EBEL, J. P. (1967), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49, 1665.
- DUVAL, J. (1967), *Thèse doctorat ès-sciences, Strasbourg*.
- EBEL, J. P., WEIL, J. H., RETHER, B. et HEINRICH, J. (1965), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, 1599.
- EBEL, J. P. (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 2255.
- ENGLANDER, S. W. et ENGLANDER, J. J. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53, 370.
- EVERETT, G., MERRILL, S. et HOLLEY, R. (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 5757.
- FASMAN, G. D., LINDBLOW, C. et GROSSMAN, L. (1964), *Biochemistry*, 3, 1015.
- FASMAN, G. D., LINDBLOW, C. et SEAMAN, E. (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 630.
- FRESCO, J. R., ALBERTS, B. M. et DOTY, P. (1960), *Nature*, 188, 98.
- FRESCO, J. R., ADAMS, A., ASCIONE, R., HENLEY, D. et LINDAHL, T. (1966), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31, 527.

- FULLER, W. (1960), J. Mol. Biol., 3, 175.
- GHOSH, H. P., SÖLL, D. et KHORANA, H. G. (1967), J. Mol. Biol., 25, 275.
- GIACONOMI, D. et SPIEGELMAN, S. (1962), Science, 138, 1328.
- GIEGE, R. et EBEL, J. P. (1968), Biochim. Biophys. Acta, 161, 125.
- GIEGE, R., HEINRICH, J., WEIL, J. H. et EBEL, J. P. (1969), Biochim. Biophys. Acta, 174, 43.
- GILLAM, I., MILLWARDS, S., BLEW, D., VON TIGERSTROM, M., WIMMER, E. et TEUER, G. M. (1967), Biochemistry, 6, 3043.
- GILLAM, I., BLEW, D., WARRINGTON, R. C., VON TIGERSTROM, M. et TEUER, G. M. (1968), Biochemistry, 7, 3459.
- GOLDWHAIT, D. A. et KERR, O. S. (1962), Biochim. Biophys. Acta, 61, 930.
- GOODMAN, H. M., ABELSON, J., LANDY, A., BRENNER, S. et SMITH, J. D. (1968), Nature, 217, 1019.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. S., DAVID, M. M. (1949), J. Biol. Mol., 177, 751.
- GRUNBERG-MANAGO, M. et MICHELSON, A. (1964), Biochim. Biophys. Acta, 80, 431.
- HARDING, U., SCHAUER, H. et HARTMAN, G. (1966), Biochemische Zeitschrift, 246, 212.
- HARTMAN, G. et COY, U. (1961), Biochim. Biophys. Acta, 47, 612.
- HENLEY, D., LINDAHL, T. et FRESCO, J. R. (1966), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 191.
- HOAGLAND, M., ZAMECNIK, P. et STEPHENSON, M. (1957), Biochim. Biophys. Acta, 24, 215.
- HOAGLAND, M. (1959), BROOKHAVEN Symp. Biol., 12, 40.
- HOLCOMB, D. N. et TINOCO, I. Jr (1965), Biopolymers, 3, 121.
- HOLLEY, R. W. et MERRILL, S. H. (1959), J. Am. Chem. Soc., 5, 753.
- HOLLEY, R. W., APGAR, J. et DOCTOR, B. P. (1960), Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, 745.
- HOLLEY, R. W., APGAR, J., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., MERRILL, S. H. et ZAMIR, A. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 117.
- HOLLEY, R. W., APGAR, J., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., MARQUISEE, M. MERRILL, S. H., PENSWICK, J. R. et ZAMIR, A. (1965), Science 147, 1462.

- HOSKINSON, R.M. et KHORANA, H.G. (1965), J. Biol. Chem., 240, 2129.
- ISHIKURA, H. et NISHIMURA, S. (1968), Biochim. Biophys. Acta, 155, 72.
- JAMES, H.L., ZEKAVAT, S.Y., MORRISON, J.C. et BUCOVAZ, E.T. (1967), Fed. Proc., 869.
- JONES, D.S., NISHIMURA, S. et KHORANA, H.G. (1966), J. Mol. Biol., 16, 454.
- KAJI, H., SUZUKA, I. et KAJI, A. (1966), J. Biol. Chem., 241, 1251.
- KAJI, H. et TANAKA, Y. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 138, 642.
- KATCHALSKI, E., YANKOFISKY, S., NOVOGRODSKY, A., GALENTER, Y. et LITTAUER, U.Z. (1966), Biochim. Biophys. Acta, 123, 641.
- KAWADE, Y., OKAMOTO, T. et YAMAMOTO, Y. (1963), Biochem. Biophys. Res. Comm., 10, 200.
- KAY, C.M. et OIKAWA, K. (1966), Biochemistry, 5, 213.
- KELMERS, A.D., NOVELLY, G.D. et STULBERG, M.P. (1965), J. Biol. Chem., 240, 3979.
- KELMERS, A.D. (1966 a), J. Biol. Chem., 241, 3540.
- KELMERS, A.D. (1966 b), Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, 562.
- KIM, S.H. et RICH, A. (1968), Science, 162, 1381.
- KOTIN, L. et LYONS, J.W. (1965), J. Am. Chem. Soc., 87, 1781.
- LAMBORG, M.R., ZAMECNIK, P.C., LI, T., KÄGI, J. et VALLEE, B.L. (1965), Biochemistry, 4, 63.
- LEGOCKI, A.B. et PAWELKIEWICZ, J. (1967), Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol., 15, 517.
- LINDAHL, T., ADAMS, A., FRESCO, J.R. (1966), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 941.
- LINDAHL, T., ADAMS, A., FRESCO, J.R. (1967), J. Biol. Chem., 242, 3129.
- LIPSETT, M.N. (1964), J. Biol. Chem., 239, 1250.
- LITTAUER, U.Z., SIMON, S. et KATCHALSKI, E. (1964), Symp. on Nucl. Acids Structure Biosynthesis and Function.
- MADISON, J.T., EVERETT, G.A. et KUNG, H.K. (1966), Science, 153, 351.
- MAXWELL, I.H., WIMMER, E. et TEUER, G.M. (1968), Biochemistry, 7, 2629.

- Mc CULLY, K. et CANTONI, G. (1962), J. Mol. Biol., 5, 497.
- Mc DONALD, C.C., PHILLIPS, W.D. et PENSWICK, J. (1965), Biopolymers, 3, 609.
- Mc LAUGHLIN, C.S. et GRUNBERG-MANAGO, M. (1965), Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 1715.
- MEHLER, A.H. et BANK, A. (1963), J. Biol. Chem., 238, pc 2888.
- MELCHERS, F. et ZACHAU, H.G. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 95, 380.
- MILLAR, D.B. et STEINER, R.F. (1966), Biochemistry, 5, 2289.
- MILLAR, D.B. et Mc KENZIE, M. (1967), Biochemistry, 6, 2520.
- MIRZABEKOV, A.D., KRUTILINA, A.I. et BAEV, A.A. (1966), Biochim. Biophys. Acta, 129, 426.
- MIRZABEKOV, A.D., GRÜNBERGER, D., HOLY, A., BAEV, A.A. et SORM, F. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 145, 845.
- MIURA, K. (1967), Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol., 6, 39.
- MIYAZAKI, M. et TAKEMURA, S. (1966 a), J. Biochem., 60, 526.
- MIYAZAKI, M., KAWADE, M. et TAKEMURA, S. (1966 b), J. Biochem., 60, 519.
- MIYAZAKI, M., KAWATA, M., NAKAZAWA, K. et TAKEMURA, S. (1967), Journal of Biochemistry, 62, 161.
- MOFFIT, W. (1956), J. Chem. Phys., 25, 467.
- MOFFIT, W., FITTS, D.D. et KIRWOOD, J.G. (1957), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 43, 723.
- MOMMAERTS, F.H.M., BRAHMS, J., WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1964), C.R. Acad. Sci. Paris, 258, 2687.
- MONIER, R., STEPHENSON, M.L. et ZAMECNIK, P.C. (1960), Biochim. Biophys. Acta, 43, 1.
- MUENCH, K.H. et BERG, P. (1966), Biochemistry, 5, 970.
- NATHENSON, S.G., DOHAN, F.C. Jr, RICHARDS, H.H. et CANTONI, G.L. (1965), Biochemistry, 4, 2412.
- NELSON, J.A., RISTOW, S.C. et HOLLEY, R.W. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 149, 590.
- NIRENBERG, M. et MATTHAEI, J. (1961), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 1580 et 1588.

- NIRENBERG, M. et LEDER, P. (1964), *Science*, 148, 1399.
- NIRENBERG, M., LEDER, P., BERNFIELD, M., BRIMACOMBE, R., TRUPIN, J., ROTTMAN, F. et O'NEAL, C. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53, 1161.
- NISHIMURA, S. et NOVELLY, G.D. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 11, 161.
- NISHIMURA, S., HARADA, F., NARUSHIMA, U. et SENNO, T. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 133.
- NISHIYAMA, K., OKAMOTO, T., WATANABE, I. et TAKANAMI, M. (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 193.
- OKAMOTO, T. et KAWADE, Y. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 13, 324.
- OLD, D. et GORINI, L. (1965), *Science*, 150, 1290.
- PEARSON, R.I. et KELMERS, A.D. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 767.
- PENNISTON, J.T. et DOTY, P. (1963), *Biopolymers*, 1, 145.
- PENSWICK, J.R. et HOLLEY, R.W. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53, 543.
- PETSKA, S., MARSHALL, R. et NIRENBERG, M. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53, 639.
- PETSKA, S. et NIRENBERG, M. (1966), *J. Mol. Biol.*, 21, 145.
- PETSKA, S. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 367.
- POLAND, D., VOURNAKIS, J.N. et SCHERAGA, M.A. (1966), *Biopolymers*, 4, 223.
- RAJBHANDARY, U.L., CHANG, S.H., STUART, A., FAULKNER, R.D., HOSKINSON, R.M. et KHORANA, H.G. (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57, 751.
- REVEL, M. et LITTAUER, U.Z. (1966), *J. Mol. Biol.*, 15, 389.
- RÖSHENTHALER, R. et FROMAGEOT, P. (1965), *J. Mol. Biol.*, 11, 458.
- SARKAR, P.K., WELLS, B. et YANG, J.T. (1967), *J. Mol. Biol.*, 25, 563.
- SARIN, P.S. et ZAMECNIK, F.C. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 20, 400.
- SARIN, P.S. et ZAMECNIK, F.C. (1965a), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19, 198.

- SCHWEIGER, M. et ZACHAU, H.G. (1965), Hoppe Seyler's Z. für Physiol. Chem., 342, 93.
- SEEDS, N.W. et CONWAY, T. (1966), Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 111.
- SMITH, K.C., CONDES, E. et SCHWEET, R.S. (1959), Biochim. Biophys. Acta, 33, 286.
- SMITH, J.D. (1966), Meeting Brit. Biophys. Soc., London, Communic. Abstract, p. 11.
- SO, A.G. et DAVIE, E. (1963), Biochemistry, 2, 132.
- SO, A.G. et DAVIE, E. (1964), Biochemistry, 3, 1165 et 1977.
- SÖLL, D. et RAJBHANDARY, U.I. (1967), J. Mol. Biol., 29, 113.
- SONNENBLICHER, J., FELDMANN, H. et ZACHAU, H.G. (1963), Hoppe Seyler's Z. für Physiol. Chem., 334, 283.
- STAEHELIN, M., ROGG, H., BAGULEY, B.C., GINSBERG, T. et WEHRLI, W. (1968), Nature, 219, 1363.
- STANLEY Jr, W.M. et BOCK, R.M. (1965), Analyt. Biochem., 13, 43.
- STEPHENSON, M.L. et ZAMECNIK, P.C. (1961), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 1627.
- STEPHENSON, M.L. et ZAMECNIK, P.C. (1962), Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 91.
- STULBERG, M.P. et ISHAM, K.R. (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1310.
- SUEOKA, N. et CHENG, T.Y. (1962), J. Mol. Biol., 4, 161.
- SUEOKA, N. et YAMANE, T. (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 1454.
- SUEOKA, N., KANO-SUEOKA, T. et GARTLAND, W.J. (1966), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 571.
- SZER, W. et OCHOA, S. (1964), J. Mol. Biol., 8, 823.
- TAKEISHI, K., NISHIMURA, S. et UKITA, T. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 145, 605.
- TAKEMURA, S., MIZUTANI, T. et MIYAZAKI, M. (1968), J. Biochem. 63, 274.
- TANAKA, K., RICHARDS, H.H. et CANTONI, G.L. (1962), Biochim. Biophys. Acta, 61, 846.
- THANG, M.N., GUSCHLBAUER, W., ZACHAU, H.G. et GRUNBERG-MANAGO, M. (1967), J. Mol. Biol., 26, 403.
- TINOCO, I. Jr, WOODY, R.W. et BRADLEY, D. (1963), J. Chem. Phys. 38, 1317.

- TINOCO, I. Jr (1963), *Rad. Res.*, 20, 133.
- TINOCO, I. Jr (1964), *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 297.
- TINOCO, I. Jr (1968), *J. Chim. Phys.*, 65, 91.
- VAN HOLDE, K.E., BRAHMS, J. et MICHELSON, A.M. (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 726.
- VELLUZ, L. et LEGRAND, M. (1961), *Angew. Chem.*, 76, 603.
- VON EHRENSTEIN, G. et LIPMAN, F. (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 941.
- VON PORTATIUS, H., DOTY, P. et STEPHENSON, M.L. (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 3351.
- VOURNAKIS et SCHERAGA, H.A. (1966), *Biochemistry*, 5, 2997.
- WAGNER, E.K. et INGRAM, U.M. (1966), *Biochemistry*, 5, 3019.
- WARNER, R. et WAIMBERG, P. (1958), *Fed. Proc.*, 17, 331.
- WARSHAW, M.M. et TINOCO, I. Jr (1965), *J. Mol. Biol.*, 13, 54.
- WATSON, J.D. et CRICK, F.H.C. (1953), *Nature*, 171, 737.
- WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 836.
- WEIL, J.H., BEFORT, N., RETHER, B. et EBEL, J.P. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 15, 447.
- WEIL, J.H. (1964), Thèse doctorat ès-sciences, Strasbourg.
- WEIL, J.H., BAKES, J., HEINRICH, J. et EBEL, J.P. (1966), *Abstracts 3rd F.E.B.S. Meeting (Warsaw)*, p. 18.
- WIMMER, E., MAXWELL, I.H. et TEUER, G.M. (1968), *Biochemistry*, 7, 2623.
- YANIV, M. et BARRELL, B.G. (1969), *Nature*, 222, 278.
- YOSHIDA, M. et UKITA, T. (1965), *J. Biochem. Tokyo*, 57, 818 et 58, 191.
- YOSHIDA, H., DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1966), *C.R. Acad. Sci. Paris*, 262, 233.
- YU, C. et ZAMECNIK, P. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 209.
- ZACHAU, H.G., TADA, M., LAWSON, W.B. et SCHWEIGER, M. (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 221.
- ZACHAU, H.G., DÜTTING, D., FELDMANN, H., MELCHERS, F. et KARAU, W. (1966 a), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31, 417.

- ZACHAU, H.G., DÜTTING, D. et FELDMANN, H. (1966 b), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 347, 212.
- ZAMECNIK, P.C., STEPHENSON, M.L. et SCOTT, J.F. (1960), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46, 811.
- ZIMM, B.H. et KALLENBACH, N.R. (1962), Ann. Rev. Phys. Chem., 13, 171.
- ZIMMER, A. (1968) Thèse de Doctorat du Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät - WURZBURG.
- ZUBAY, G. (1962), J. Mol. Biol., 1, 365.

ABREVIATIONS

RNA	acide ribonucléique
tRNA	acide ribonucléique de transfert
sRNA	acide ribonucléique soluble
mRNA	acide ribonucléique messenger
DNA	acide désoxyribonucléique
TMV	virus de la mosaïque du tabac
TYMV	virus de la mosaïque jaune du tabac
E. coli	Escherichia coli
A , G , U , C	adénine, guanine, uracile, cytosine
T	ribosylthymine
Ψ	pseudouridine
H ₂ U	dihydrouridine
Pu	nucléoside purique
BrU , BrC	bromouracile , bromocytosine
poly A, poly U, poly C, poly G	acide polyadénylique, acide polyuridylique, acide polycytidylique, acide polyguanylique
poly BrU , poly BrC	acide polybromouridylique, acide polybromo- cytidylique
poly UA	copolymère acide uridylique, acide adénylique
poly UC	copolymère acide uridylique, acide cytidylique
poly AG	copolymère acide adénylique, acide guanylique
poly (A + U)	complexe obtenu à partir d'un mélange de poly A et poly U
poly (G + C)	complexe obtenu à partir d'un mélange de poly G et poly C
ATP	adénosine triphosphate
GTP	guanosine triphosphate

DMF	diméthylformamide
Tris	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique (sel disodique)
DEAE -	diéthylaminoéthyl -
ABNCA	anhydride du benzyl-N-carboxy-aspartate
PBA	polybenzylaspartate
RNase	ribonucléase
DNase	désoxyribonucléase
D. C.	dichroïsme circulaire
D. O.	densité optique
U. V.	ultraviolet
$\Delta \epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d$	différence entre le coefficient d'absorption des vibrations circulaires gauche et droite
$\Delta \epsilon_{\max}$	valeur de $\Delta \epsilon$ à la longueur d'onde du maximum de la première bande positive du spectre dichroïque
T _m	température de demi "dénaturation thermique"
ΔH	enthalpie
q. s. p.	quantité suffisante pour...
CPM	coups par minute
T	température absolue
R	constante des gaz parfaits

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
------------------------	---

PREMIERE PARTIE

METHODES DE FRACTIONNEMENT DU PHENYLALANINE ET DE L'ISOLEUCINE-tRNA	5
--	---

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES DIFFERENTES METHODES DE FRACTIONNEMENT DES tRNA	5
---	---

A. <u>METHODES PHYSICOCHEMISTIQUES</u>	5
--	---

I. DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT	6
---	---

II. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	6
---	---

1) Chromatographie d'adsorption	6
---	---

2) Chromatographie de partage	7
---	---

a - Chromatographie d'exclusion-diffusion ou tamisage moléculaire	7
--	---

b - Chromatographie de partage	8
--	---

3) Chromatographie par échange d'ions	9
---	---

III. PRECIPITATION FRACTIONNEE	11
--	----

B. <u>METHODES CHIMIQUES</u>	11
--	----

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT PAR DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT DU PHENYLALANINE-tRNA DE LEVURE DE BIERE	15
---	----

I. <u>CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	15
---	----

1) Distribution en contre-courant	15
---	----

2) Récupération des tRNA à partir des fractions du contre-courant	17
---	----

3) Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases	17
---	----

a - Broyage des cellules	18
------------------------------------	----

b - Elimination des aminoacides	18
---	----

c - Elimination des tRNA contenus dans la préparation par chromatographie sur DEAE-cellulose	19
---	----

d - Dosage de la préparation enzymatique	19
--	----

4) Détermination de l'activité acceptrice des tRNA	19
--	----

II. <u>RESULTATS</u>	20
1) Phénylalanine-tRNA	22
2) Isoleucine-tRNA	23

CHAPITRE III

ESSAI DE PURIFICATION DE L'ISOLEUCINE-tRNA PAR LA TECHNIQUE DE KATCHALSKI	24
I. <u>PRINCIPE DE LA METHODE</u>	24
II. <u>MECANISME REACTIONNEL</u>	24
1) L'initiateur s'additionne sur le carbonyl-5 d'une molécule d'ABNCA avec formation d'un dimère activé	24
2) Décomposition de ce dimère en acide carbamique instable	25
3) Décarboxylation qui donne lieu à la formation de l'amide de l'acide	25
4) Fin de la réaction	25
III. <u>CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	26
1) Préparation du tRNA de levure de boulangerie	26
2) Dosage des protéines par la méthode au biuret	27
3) Préparation de l'isoleucyl-tRNA	27
4) Polymérisation	27
5) Elimination des tRNA libres	28
6) Elimination du PBA	28
7) Régénération du tRNA	28
IV. <u>RESULTATS</u>	30
1) Etude de l'enrichissement en tRNA ^{Ile} sous forme de PBA- isoleucyl-tRNA	30
a - Influence du rapport concentration en ABNCA/concentration en aminoacyl-tRNA	30
b - Influence de la concentration en protéines	33
c - Influence du taux de fixation au départ	34
2) Régénération du tRNA ^{Ile} à partir du PBA-isoleucyl-tRNA	37
a - Elimination des traces de RNase contenues dans la pronase	37
b - Taux de purification final et activité biologique du tRNA préparé	38
V. <u>RENDEMENT DE LA PREPARATION</u>	40
VI. <u>DISCUSSION</u>	40

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA CONFORMATION DES tRNA PAR DICHROISME CIRCULAIRE	43
---	----

CHAPITRE IV

ETAT ACTUEL DU PROBLEME DE LA CONFORMATION DES tRNA	43
---	----

CHAPITRE V

THEORIE DU DICHROISME CIRCULAIRE	50
--	----

CHAPITRE VI

RESULTATS DE LA CONFORMATION DES tRNA PAR DICHROISME CIRCULAIRE	57
---	----

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Matériel	57
2) Mesures	57
a - Dichroïsme circulaire	57
b - Dosage du phosphore	60
c - Courbe de "fusion".	61
d - Hydrolyse partielle du tRNA ^{Ala}	61

II. DETERMINATION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DES tRNA

a - A faible force ionique	64
b - A force ionique plus importante	64
c - En présence de magnésium	64

III. EFFET DE LA CONCENTRATION EN tRNA

IV. DENATURATION THERMIQUE DU tRNA

a - De 0 à 20°	69
b - Au-delà de 20°	73

V. EFFET DU MAGNESIUM SUR LE SPECTRE DE D.C.

VI. ETUDE DE LA REVERSIBILITE

VII. VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

VIII.	<u>ETUDE D'UN tRNA^{Ala} SOUMIS A UNE HYDROLYSE PARTIELLE</u>	82
IX.	<u>DETERMINATION THEORIQUE DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DU tRNA^{Phe}</u>	84
X.	<u>MISE EN EVIDENCE D'UNE DIFFERENCE DE CONFORMATION ENTRE UN tRNA NON CHARGE ET UN tRNA CHARGE</u>	87
	a - A faible force ionique.	87
	b - A force ionique plus importante	91
XI.	<u>DISCUSSION</u>	91

TROISIEME PARTIE

	EFFET DE LA BROMURATION DU tRNA SUR L'INCORPORATION DES AMINOACIDES DANS LES PROTEINES : ERREURS PROVOQUEES PAR LA BROMURATION DU tRNA	97
--	--	----

CHAPITRE VII

I.	<u>INTRODUCTION</u>	97
II.	<u>CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	100
	1) Bromuration du tRNA	100
	2) Préparation des ¹⁴ C-aminoacyl-tRNA	102
	3) Incorporation des aminoacides dans les protéines à partir des aminoacyl-tRNA témoins ou bromés	103
	a - Préincubation de l'extrait brut	104
	b - Transfert des ¹⁴ C-aminoacyl-tRNA dans les protéines	104
	4) Complexe aminoacyl-tRNA-mRNA-ribosomes	106
	a - Préparation des ribosomes de E. coli	106
	b - Préincubation des ribosomes	106
	c - Milieu réactionnel	107
III.	<u>RESULTATS</u>	107
	A. <u>EFFETS DE LA BROMURATION DU tRNA SUR L'INCORPORATION DES AMINOACIDES DANS LES PROTEINES EN PRESENCE DE POLY U</u>	107
	B. <u>EFFETS DE LA BROMURATION SUR L'INCORPORATION D'AMINOACIDES EN PRESENCE DE RNA MESSAGER NATUREL</u>	111

a - Effet de la bromuration sur l'incorporation anormale de l'isoleucine en présence de mRNA naturel	113
b - Effet compétitif exercé par le phénylalaninyl-tRNA sur l'incorporation anormale de l'isoleucine à partir de l'isoleucyl-tRNA bromé	115
C. <u>EFFET DE LA BROMURATION SUR LA FORMATION DU COMPLEXE AMINOACYL-tRNA-poly U-RIBOSOMES</u>	117
IV. <u>DISCUSSION</u>	118
RESUME ET CONCLUSION	127
BIBLIOGRAPHIE	131
ABREVIATIONS	141
TABLE DES MATIERES	143

